论著

文章编号:1000-5404(2008)05-0414-03

血管紧张素Ⅱ诱导人脐静脉内皮细胞凋亡

杨丽霞,沈珠甫,郭瑞威,齐 峰 (成都军区昆明总医院心内科,昆明 650032)

摘 要:目的 探讨AngⅡ诱导人血管内皮细胞Ⅱ凋亡的作用及其机制。方法 原代培养人脐静脉血管内皮细胞,用不同浓度AngⅡ及神经酰胺合成酶抑制剂烟曲霉素B1(fumonisin B1,FB1)处理细胞,采用TUNEL法检测细胞凋亡,RT-PCR、Western blot技术对bax mRNA及蛋白进行表达分析。结果 AngⅡ处理组内皮细胞的凋亡阳性率显著高于对照组($P<0.05$)且具有时间和剂量依赖性,对照组和10^{-7}、10^{-6}、10^{-5} mol/L AngⅡ处理24 h后各组细胞凋亡率分别为(2.2±1.1)%、(6.0±1.2)%、(17.5±2.3)%、(27.4±4.5)% 终浓度10^{-6} mol/L的AngⅡ处理6、24、48 h后细胞凋亡率分别为(6.2±2.3)% 、(15.5±3.1)% 、(21.6±2.5)%;FB1能显著抑制AngⅡ诱导的内皮细胞凋亡($P<0.05$),AngⅡ处理组bax mRNA及蛋白的表达较对照组显著升高($P<0.05$),FB1组bax mRNA和蛋白表达较对照组没有显著变化($P>0.05$)。结论 AngⅡ通过神经酰胺及bax诱导细胞凋亡,其中bax作为神经酰胺的下游基因起作用。

关键词:血管紧张素Ⅱ;内皮细胞;凋亡
中图法分类号:R322.123;R329.25 文献标识码:A

Apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by angiotensin Ⅱ and its mechanism

YANG Li-xia, SHEN Zhu-fu, GUO Rui-wei, QI Feng (Department of Cardiology, Kunming General Hospital of Chengdu Command, Kunming 650032, China)

Abstract: Objective To study the effect of angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ) on apoptosis in endothelial cells (EC). Methods Human umbilical endothelial cells were cultured *in vitro* and treated with Ang Ⅱ in various concentrations alone and in combination with fumonisin B1 (FB1, an inhibitor of ceramidase). TUNEL was employed to determine the apoptosis of the cultured EC. The bax mRNA and protein levels of EC were detected by RT-PCR and Western-blot techniques. Results The results showed that the number of apoptotic cells was significantly higher in Ang Ⅱ-treated endothelium than in the control group ($P<0.05$). Ang Ⅱ induced EC apoptosis in time- and dose-dependant manner. The percentage of the apoptotic EC were (2.2±1.1)%, (6.0±1.2)%, (17.5±2.3)%, (27.4±4.5)% respectively after treatment with Ang Ⅱ at various concentrations (0, 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5} mol/L) for 24 h. Exposing to 10^{-6} mol/L Ang Ⅱ for 6, 12 and 24 h, the rate of apoptotic cells were (6.2±2.3)%, (15.5±3.1)%, and (21.6±2.5)% respectively. Compared to Ang Ⅱ group, FB1 inhibited EC apoptosis induced by Ang Ⅱ ($P<0.05$). The expression of bax mRNA and protein in EC treated with Ang Ⅱ significantly increased ($P<0.05$) but not significant with the FB1 group ($P>0.05$). Conclusion Ang Ⅱ may induce apoptosis of endothelial cells *via* ceramide and up-regulating the bax mRNA and protein expression. Ceramide is the upper stream of bax and induces apoptosis by bax pathway.

Key words: angiotensin Ⅱ; endothelium; apoptosis

血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)作为肾素-血管紧张素系统中重要的因子,是机体的主要调节因子之一,发挥多种生物功能[1]。血管紧张素Ⅱ的致病性主要与其诱导凋亡有关,因此研究AngⅡ诱导血管内皮细胞凋亡的调控机制具有重要意义[2]。本研究采用体外细胞培养方法,观察AngⅡ对血管内皮细胞凋亡的产生及凋亡相关基因的变化,探讨AngⅡ在内皮细胞凋亡过程中的可能机制,为心血管病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

参照Madan等[3]方法分离人脐静脉内皮细胞,在37 ℃、5% CO_2条件下培养于DMEM培养基中(含有10%胎牛血清、100 U/ml青/链霉素),胰酶消化、传代。

1.2 试剂

AngⅡ(Sigma公司),FB1(Cayman公司),TUNEL凋亡试剂盒(中杉公司),胎牛血清(HyClone公司);二步法RT-PCR试剂

作者简介:杨丽霞,女,云南省大理市人,博士,主任医师,教授,主要从事冠心病的发病机制及介入诊治方面的研究。电话:(0871) 4074571, E-mail:doctorylixia@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-11-30;修回日期:2008-01-04

盒(TaKaRa 公司)；鼠抗人 bax 单克隆抗体(Santa Cruz 公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　AngⅡ诱导血管内皮细胞凋亡　　取对数生长期的血管内皮细胞，稀释成 1×10^4 ml^{-1}，接种于含有无菌盖玻片的 6 孔培养板，待细胞贴壁后，然后加药组加入终浓度 10^{-7} mol/L、10^{-6} mol/L 和 10^{-5} mol/L 的 AngⅡ，24 h 后 TUNEL 法检测细胞凋亡。加入终浓度为 10^{-6} mol/L 的 AngⅡ，分别干预内皮细胞 6、24、48 h 后 TUNEL 法检测细胞凋亡。200 倍光镜下每张切片取 5 个视野，计算凋亡细胞数占总细胞数的百分比。

1.3.2　神经酰胺合成酶抑制剂烟曲霉素 B1(fumonisin B1，FB1)抑制 AngⅡ诱导的内皮细胞凋亡　　FB1 预处理细胞，再加入 AngⅡ 24 h 后与对照组比较观察细胞凋亡情况。

1.3.3　半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定 bax mRNA　　不同浓度 AngⅡ处理细胞 24 h 后收集细胞。用 Trizol 裂解提取总 RNA，并测定其浓度和纯度。取 1 μg 总 RNA 在20 μl 体系中逆转录合成 cDNA，分别取 2 μl cDNA 产物进行 bcl-2 和 β-actin 的聚合酶链反应(PCR)。Bax 正反义序列分别是：5′-AGCTCTGAGCAGATCATGAAGAC-3′、5′-AGTTGAAGTTGCCGTCAGAAAAC-3′，扩增片段长度 277 bp，退火温度为 60 ℃，进行 30 个循环。β-actin 正反义序列分别是：5′-ATCATGAAGTGTGACGTGGACAT-3′、5′-AGGAGCAATGATCTTGATCTTCA-3′，扩增片段长度 153 bp，退火温度为 57 ℃，进行 30 个循环。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳分离，紫外线下观察和照相，数字成像系统进行面积和密度扫描。

1.3.4　Western blot 测定 bax 蛋白　　提取细胞总蛋白，蛋白浓度用 Lowry 法定量。以 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白，将分离的蛋白转移至硝酸纤维素膜上，封闭 1 h，加入 β-actin 小鼠抗大鼠单克隆抗体(1∶5 000)，室温摇床孵育 1 h，加入抗 bax 单克隆抗体，4 ℃孵育过夜后置于 700 nm 荧光抗小鼠 IgG 二抗(1∶5 000)中，在室温摇床避光孵育 30 min，在 Odyssey 荧光扫描分析系统下扫描。

1.4　统计学分析

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析。

2　结果

2.1　AngⅡ诱导血管内皮细胞凋亡

2.1.1　AngⅡ呈剂量依赖性诱导内皮细胞凋亡　　结果显示，对照组细胞凋亡率为(2.2 ± 1.1)%，而用终浓度分别为 10^{-7}、10^{-6}、10^{-5} mol/L 的 AngⅡ干预内皮细胞培养 24 h 后，细胞凋亡率随干预剂量加大而逐渐上升，分别为(6.0 ± 1.2)%、(17.5 ± 2.3)% 与(27.4 ± 4.5)%，与对照组比较，细胞凋亡率均明显增高($P<0.05$)。

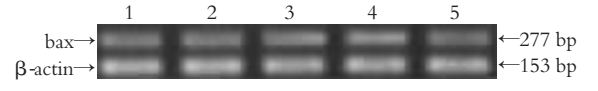
2.1.2　AngⅡ呈时间依赖性诱导内皮细胞凋亡　　对加入终浓度为 10^{-6} mol/L AngⅡ的干预组进行研究，分别对干预 6、24、48 h 后的细胞凋亡率进行检测，结果显示，各组细胞凋亡率逐渐增加，分别为(6.2 ± 2.3)%、(15.5 ± 3.1)% 及(21.6 ± 2.5)%，与对照组(2.2 ± 1.1)% 比较差异均显著($P<0.05$)。

2.2　FB1 抑制 AngⅡ诱导的内皮细胞凋亡

先用 FB1 预处理细胞，再加入 AngⅡ，干预 24 h 后检测细胞凋亡率，结果显示，经 FB1 预处理组细胞凋亡率较 AngⅡ干预组明显降低($P<0.05$)，分别为(3.0 ± 1.1)% 与(16.0 ± 2.2)%，而与对照组(2.2 ± 1.1)% 比较则无显著差异($P>0.05$)。

2.3　bax mRNA 的表达

RT-PCR 结果见图 1，不同浓度 AngⅡ处理血管内皮细胞后，bax mRNA 表达逐渐增加，以内参照 β-actin 校正，校正值分别与对照组比较有显著差异($P<0.05$)，AngⅡ + FB1 组与对照组比较无明显差异($P>0.05$)，见表 1。



1－5：分别为 0、10^{-7}、10^{-6}、10^{-5} mol/L AngⅡ，10^{-6} mol/L AngⅡ + FB1

图 1　AngⅡ诱导的细胞凋亡中 bax mRNA 的表达

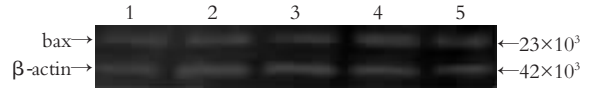
表 1　bax mRNA 和蛋白在各组间的表达水平($\bar{x}\pm s$)

组别	mRNA 表达	蛋白表达
对照组	0.586 ± 0.127	0.753 ± 0.096
AngⅡ 组		
10^{-7}mol/L	0.754 ± 0.112	0.924 ± 0.103[a]
10^{-6}mol/L	0.854 ± 0.098[a]	0.965 ± 0.110[a]
10^{-5}mol/L	0.998 ± 0.106[a]	1.104 ± 0.116[a]
10^{-6}mol/L AngⅡ + FB1 组	0.528 ± 0.131[b]	0.792 ± 0.087[b]

a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与 10^{-6}mol/L AngⅡ组比较

2.4　bax 蛋白的表达

Western blot 结果见图 2，正常内皮细胞对照组和不同浓度的 AngⅡ作用组都可见 bax 蛋白的表达，经 β-actin 标准化后，可见 bax 蛋白表达逐渐增加，与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)，AngⅡ + FB1 组与对照组比较无明显差异($P>0.05$)。



1－5：分别为 0、10^{-7}、10^{-6}、10^{-5} mol/L AngⅡ，10^{-6} mol/L AngⅡ + FB1

图 2　AngⅡ诱导的细胞凋亡中 bax 蛋白的表达

3　讨论

细胞凋亡广泛存在于心血管疾病病理变化中[3]，内皮细胞作为血管的内衬，其凋亡导致的功能失调是许多心血管疾病发病的基础。诱导细胞凋亡是 AngⅡ的生物学功能之一，在 AngⅡ诱导细胞凋亡过程中主要的信号转导途径有 Fas/FasL 信号系统、神经酰胺信号系统、酪氨酸蛋白激酶(PTK)/丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶-1(MKP-1)信号系统[4] 和蛋白激酶 C 信号系统[5] 等。Bax 是 bcl-2 基因家族的成员，其功能为促进细胞凋亡。本实验采用外源性 AngⅡ作用于体外培养的血管内皮细胞，结果表明 AngⅡ能诱导内皮细胞凋亡，且细胞凋亡率有时间-浓度效应关系；AngⅡ能增强内皮细胞 bax mRNA 和 bax 蛋白的表达，说明 AngⅡ诱导凋亡与 bax 基因有明确关系，这也与文献报道一致。

神经酰胺作为细胞凋亡中常见的第二信使分子，参与多种细胞系的生长、增殖、分化、凋亡及损伤等多种细胞活动[6]，尤其是在生长抑制与死亡信号的转导过程中具有重要的地位和作用。本实验中神经酰胺合成酶抑制剂 FB1 能抑制 AngⅡ诱导的凋亡，表明在

AngⅡ诱导的内皮细胞凋亡中,神经酰胺可能参与了凋亡过程。FB1则抑制了bax mRNA和bax蛋白的表达,说明bax可能出于神经酰胺的下游,并受其调控。

AngⅡ诱导细胞凋亡的机制尚未完全阐明,本研究初步探讨了外源性AngⅡ诱导人血管内皮细胞凋亡的效应及其机制,为进一步研究AngⅡ在诱导血管内皮细胞凋亡中的作用提供实验依据,并为心血管病的防治提供理论依据。

参考文献:

[1] Ferrario C M, Strawn W B. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease[J]. Am J Cardiol, 2006, 98(1): 121-128.

[2] Bonavita F, Stefanelli C, Giordano E, *et al*. H9c2 cardiac myoblasts undergo apoptosis in a model of ischemia consisting of serum deprivation and hypoxia: inhibition by PMA[J]. FEBS Lett, 2003, 536(1-3): 85-91.

[3] Wassmann S, Nickenig G. Pathophysiological regulation of the AT1-receptor and implications for vascular disease[J]. J Hypertens Suppl, 2006, 24(1): S15-S21.

[4] He M, He X, Xie Q, *et al*. Angiotensin II induces the expression of tissue factor and its mechanism in human monocytes[J]. Thromb Res, 2006, 117(5): 579-590.

[5] Mahrouf M, Ouslimani N, Peynet J, *et al*. Metformin reduces angiotensin-mediated intracellular production of reactive oxygen species in endothelial cells through the inhibition of protein kinase C[J]. Biochen Pharmacol, 2006, 72(2): 176-183.

[6] Hannun Y A. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide[J]. J Biol Chem, 1994, 269(5): 3125-3128.

(编辑 邓强庭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2008)05-0416-01

小光斑飞点扫描用于LASIK矫治高度近视散光

康 玲,汪 辉,任 茜,胡春明 (第三军医大学西南医院全军眼科中心,重庆 400038)

本研究对我院收治的高度散光患者120例,共216只眼采用ALLEGRETTO酷眼准分子激光系统矫治,探讨其安全性、有效性、预测性和稳定性。

1 资料与方法

选择我院眼科2005年7月至2006年7月行LASIK手术的高度散光患者120例,共216只眼,其中球镜屈光度≤-6.00 D 81眼,-6.00~10.00 D 86眼,≥-10.00 D 49眼,年龄18~40岁,最佳矫正远视力>0.6。所有患者排除角膜炎、角膜瘢痕、圆锥角膜、干眼症、睑缘炎、突眼症、全身免疫性及胶原性疾病,双眼同时接受治疗,术后12个月内能按时复查。

严格的术前检查。观察患者裸眼远视力、裸眼近视力、最佳矫正远视力、扩瞳屈光度、小瞳屈光度、眼压、眼底、角膜厚度、波前相差、角膜地形图。手术前3 d滴托百士眼液4次/d。

手术方法:术前10 min用眼用平衡液20 ml冲洗双眼结膜囊,滴托百士眼液2滴。麻醉方式为表面麻醉(倍诺喜眼液滴眼2次),用75%酒精消毒双眼后,铺无菌手术单。Moria自动旋转式板层刀制作角膜瓣后采用ALLEGRETTO酷眼准分子激光系统进行激光切削,切削光区直径6.0~6.5 mm,眼用平衡液冲洗层间,眼科专用吸血海绵刷平角膜,滴典必舒眼液2滴,纱布遮盖术眼。

术后处理:术后第1天,复查术眼视力及角膜瓣情况。采用强效激素点眼(典必舒眼液)4次/d,共7 d;同时给予金因舒滴眼液4次/d,共15 d。随访时间:术后1、10、30、90、180、360 d,以后每年1次。

统计学处理:采用SPSS 10.0统计软件进行方差分析。

作者简介:康 玲,女,四川省内江市人,护士。电话:(023)68754126,E-mail:522585025@qq.com
通信作者:汪 辉,E-mail:wh196711@vip.sina.com
收稿日期:2007-09-28;修回日期:2007-12-21

2 结果

2.1 患者裸眼远视力变化情况

由表1可见,不管是中低度还是超高度近视,术后1、3、6、12个月裸眼远视力与术前比较均有明显提高($P<0.05$),其中≥-10.00 D组与≤-6.00 D组比较,在术后3、6、12个月存在统计学差异($P<0.05$)。

2.2 最佳矫正远视力变化情况

由表1可见,最佳矫正远视力各组术后不同时期与术前比较均无统计学差异,组间比较亦无统计学差异($P>0.05$)。

表1 不同球镜伴高度散光患者裸眼远视力、最佳矫正远视力随时间的变化($\bar{x}\pm s$)

时间	裸眼远视力			最佳矫正远视力		
	≤-6.00 D	-6.00~-10.00 D	≥-10.00 D	≤-6.00 D	-6.00~-10.00 D	≥-10.00 D
术前	0.09±0.08	0.05±0.02	0.05±0.02	0.89±0.18	0.85±0.17	0.83±0.17
术后1个月	0.81±0.20[a]	0.76±0.15[a]	0.73±0.19[a]	0.87±0.22	0.85±0.14	0.76±0.22
术后3个月	0.85±0.20[a]	0.81±0.15[a]	0.74±0.20[ab]	0.82±0.22	0.80±0.20	0.75±0.21
术后6个月	0.87±0.20[a]	0.85±0.17[a]	0.75±0.22[ab]	0.80±0.27	0.79±0.21	0.77±0.21
术后12个月	0.87±0.20[a]	0.85±0.17[a]	0.75±0.23[ab]	0.82±0.24	0.80±0.22	0.77±0.23

a:$P<0.05$,与术前比较;b:$P<0.05$,与屈光度≤-6.00D组比较

2.3 术后屈光度

不管是对中低度还是超高度近视,术后12个月的实际矫正柱镜屈光度与术前预计矫正柱镜屈光度相关性好,但组间比较表明,中低度组相关性($r=0.891$)较超高度组($r=0.918$)更好。

2.4 柱镜屈光度稳定性

3组不同球镜屈光度在矫正高度散光后,其术后不同时期残余柱镜屈光度与术前比较均明显降低($P<0.05$),术后3个月以后不同时间段残余屈光度之间相互比较无统计学差异($P>0.05$)。

(下转420页)