文章编号:1000-5404(2008)10-0957-03

论著

神经酰胺对人内皮细胞凋亡及 bax、bcl-2 表达的影响

沈珠甫,杨丽霞,郭瑞威,杨 栋,齐 峰,石燕昆 (成都军区昆明总医院心血管内科,昆明 650032)

摘 要:目的 观察外源性神经酰胺(C_2-ceramide)对内皮细胞凋亡及相关基因 bax 和 bcl-2 表达变化的影响。**方法** 原代培养人脐静脉血管内皮细胞,加药组加入终浓度分别为5、12.5、25、50 μmol/L 的 C_2-ceramide,对照组加入体积分数为0.1%的无水乙醇。采用 TUNEL 法检测细胞凋亡,用 RT-PCR、Western blot 技术对 bax mRNA、bcl-2 mRNA 及蛋白表达进行分析。**结果** 加药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;加药组 bax mRNA 及蛋白的表达较对照组显著升高($P<0.05$),bcl-2 mRNA 及蛋白的表达较对照组则显著降低($P<0.05$)。**结论** 外源性神经酰胺通过上调 bax 及下调 bcl-2 表达水平,改变 bax/bcl-2 值,从而诱导内皮细胞凋亡。

关键词: 神经酰胺;内皮细胞;凋亡;bax;bcl-2
中图法分类号: R322.123;R329.2;R965 **文献标识码:** A

Effects of ceramide on apoptosis of human endothelial cells and expressions of bcl-2 and bax

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

Abstract: Objective To observe the effect of ceramide on apoptosis of endothelial cells (EC) and determine the relationship between the ceramide-induced growth suppression and the expressions of bax and bcl-2. Methods Human umbilical endothelial cells were cultured *in vitro* and treated with 5, 12.5, 25, 50 μmol/L C_2-ceramide, the cells treated with absolute alcohol as control. TUNEL was employed to determine the apoptosis of the cultured EC. Bax and bcl-2 mRNA and protein levels of EC were detected by RT-PCR and Western blot. Results The number of apoptotic cells was significantly higher in ceramide-treated endothelial cells than that in the control group ($P<0.05$). Ceramide-induced EC apopotsis was in time- and dose-dependent manner. Compared with the control cells, the expressions of bax mRNA and protein in EC treated with ceramide significantly increased ($P<0.05$), while the expressions of bcl-2 mRNA and protein significantly depressed ($P<0.05$). Conclusion Ceramide may induce apoptosis of endothelial cells by down-regulating bcl-2 and up-regulating bax.

Key words: ceramide; endothelial cells; apoptosis; bax; bcl-2

神经酰胺(ceramide)即 N-脂酰鞘氨醇(N-acetylsphingosine),是由细胞膜神经鞘磷脂水解产生的一种脂质分子,是神经鞘磷脂信号途径的重要第二信使[1],可介导多种细胞生物学效应。研究显示,TNF-α、Fas 抗体、电离辐射、紫外线、热休克以及抗癌药物作用引起的凋亡,均伴有细胞内神经酰胺升高[2]。内皮细胞作为血管的内衬,其功能失调是许多心血管疾病发病的基础。本研究采用体外细胞培养方法,观察神经酰胺诱导血管内皮细胞凋亡的产生及凋亡相关基因的变化,探讨神经酰胺在内皮细胞凋亡过程中可能的调节作用。

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。

作者简介:沈珠甫,男,江苏省宿迁市人,硕士研究生,主要从事冠心病发病机制方面的研究。电话:(0871)4074571,E-mail: shenzhufu@sohu.com
通信作者:杨丽霞,电话:(0871)4774573
收稿日期:2007-07-19;修回日期:2007-12-13

1.2 试剂

C_2-ceramide 购自美国 Sigma 公司，用无水乙醇配制成 50 mmol/L 储备液，-20 ℃保存。给药时无水乙醇在细胞培养液中的体积分数≤0.1%。细胞凋亡原位检测试剂盒（TUNEL）购自中杉公司，胎牛血清购自 HyClone 公司，RNA PCR Kit（AMV）Ver.3.0 购自大连宝生物工程有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 C_2-ceramide 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，加药组加入终浓度分别为 5、12.5、25、50 μmol/L 的 C_2-ceramide，对照组加入无水 0.1% 乙醇，24 h 后用 TUNEL 法检测细胞凋亡。加入终浓度为 25 μmol/L 的 C_2-ceramide，分别干预内皮细胞 6、24、48 h 后用 TUNEL 法检测细胞凋亡。在 200 倍下每张片子取 5 个视野，计算凋亡细胞数占总细胞数的百分比，即凋亡指数。

1.3.2 半定量 RT-PCR 测定 bax mRNA 及 bcl-2 mRNA 不同浓度 C_2-ceramide 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，取 2 μl cDNA 产物在 25 μl 反应体系中进行 PCR 扩增，共 30 个循环，以 β-actin 作为内参，引物序列、大小及退火温度见表 1。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳分离，紫外线下观察和照相，用数字成像系统进行面积和密度扫描。

1.3.3 Western blot 测定 bax 及 bcl-2 蛋白 提取细胞总蛋白，蛋白浓度用 Lowry 法测定含量。以 12% SDS-PAGE 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，室温摇床避光孵育 30 min，在 Odyessy 荧光扫描分析系统下扫描。

表 1 bax、bcl-2 及 β-actin 引物序列

基因	引物序列	产物长度（bp）	退火温度（℃）
bax	上游 5′-AGCTCTGAGCAGATCATGAAGAC-3′		
	下游 5′-AGTTGAAGTTGCCGTCAGAAAAC-3′	277	60
bcl-2	上游 5′-GATTGTGGCCTTCTTTGAGTTC-3′		
	下游 5′-ACTGAGCAGAGTCTTCAGAGACA-3′	230	56
β-actin	上游 5′-ATCATGAAGTGTGACGTGGACAT-3′		
	下游 5′-AGGAGCAATGATCTTGATCTTCA-3′	153	57

1.4 统计学分析

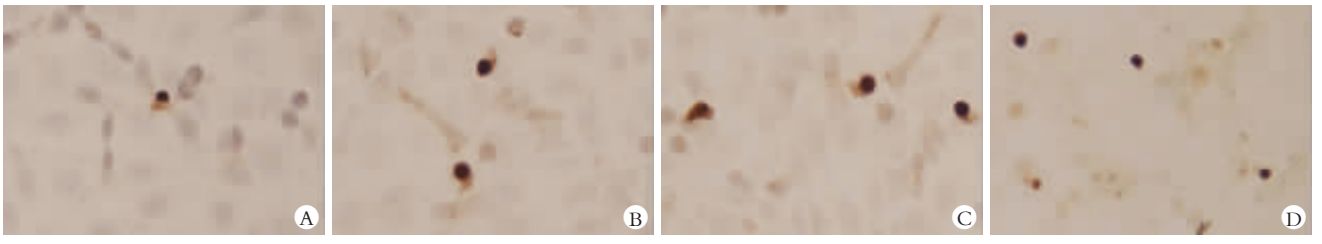
数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件对数据进行单因素的方差分析。

2 结果

2.1 C_2-ceramide 诱导血管内皮细胞凋亡

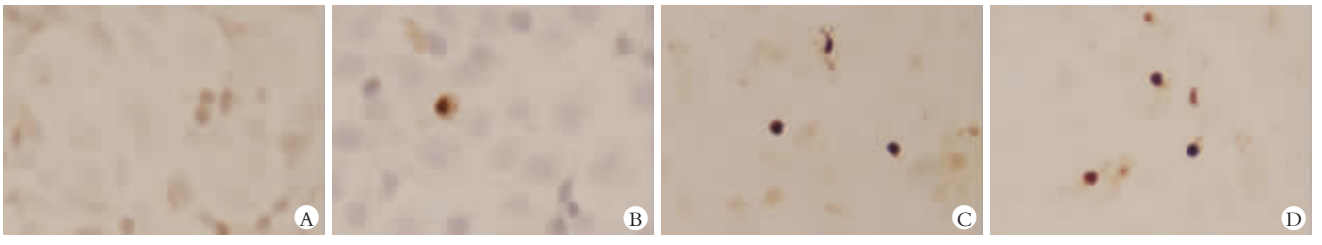
2.1.1 C_2-ceramide 呈剂量依赖性诱导内皮细胞凋亡 用终浓度分别为 5、12.5、25、50 μmol/L 的 C_2-ceramide 干预内皮细胞，培养 24 h 后，细胞的凋亡指数随干预剂量的加大逐渐上升（图 1），各浓度组凋亡指数分别为（0.13±0.01）、（0.29±0.02）、（0.34±0.03）、（0.38±0.02），较对照组（0.02±0.00）明显增高（$P<0.05$）。

2.1.2 C_2-ceramide 呈时间依赖性诱导内皮细胞凋亡 加入终浓度为 25 μmol/L 的 C_2-ceramide，分别干预内皮细胞 6、24、48 h，从 6 h 开始，细胞凋亡指数上升，并随干预时间的延长逐渐升高（图 2）。干预 24、48 h 的凋亡指数分别为（0.31±0.03）、（0.49±0.03），显著高于对照组（0.01±0.00）和 6 h 组（0.05±0.02）（$P<0.01$），而 6 h 组的凋亡指数显著高于对照组（$P<0.05$）。



A：5 μmol/L 组；B：12.5 μmol/L 组；C：25 μmol/L 组；D：50 μmol/L 组

图 1 不同浓度 C_2-ceramide 诱导的细胞凋亡（TUNEL×200）

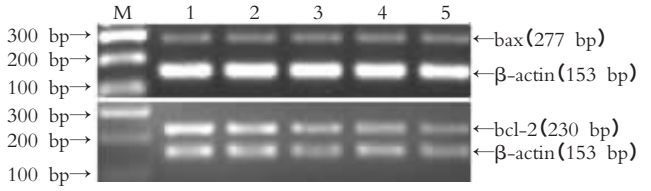


A：对照组；B：6 h 组；C：24 h 组；D：48 h 组

图 2 25 μmol/L C_2-ceramide 不同时间诱导的细胞凋亡（TUNEL×200）

2.2　bax mRNA 和 bcl-2 mRNA 的表达

RT-PCR 电泳结果显示,不同浓度 C_2-ceramide 处理血管内皮细胞后,bax mRNA 表达随浓度增加而逐渐增加,bcl-2 mRNA 表达逐渐降低(图 3)。以内参照 β-actin 校正,以校正值作为基因的表达丰度,表明 bax mRNA 和 bcl-2 mRNA 的表达丰度均呈剂量-反应关系,bax mRNA 表达随 C_2-ceramide 浓度的增加而逐渐增加,bcl-2 mRNA 的表达随 C_2-ceramide 浓度的增加而逐渐降低,且均与对照组有显著差异($P<0.05$)。

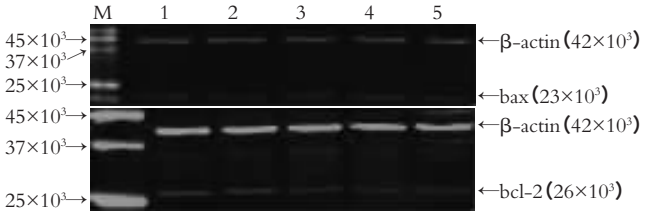


M: DNA 标准; 1: 对照组; 2: 5 μmol/L 组; 3: 12.5 μmol/L 组; 4: 25 μmol/L 组; 5: 50 μmol/L 组

图 3　C_2-ceramide 诱导的细胞凋亡中 bax mRNA 和 bcl-2 mRNA 的表达

2.3　bax 和 bcl-2 蛋白的表达

Western blot 结果显示,正常内皮细胞对照组和不同浓度的 C_2-ceramide 作用组均可见 bax 和 bcl-2 蛋白的表达(图 4)。经 β-actin 标准化后,可见 bax 蛋白表达丰度随浓度增加而逐渐增加,bcl-2 蛋白表达丰度逐渐降低,且均与对照组比较有显著差异($P<0.05$)。



M: 蛋白标准; 1: 对照组; 2: 5 μmol/L 组; 3: 12.5 μmol/L 组; 4: 25 μmol/L 组; 5: 50 μmol/L 组

图 4　C_2-ceramide 诱导的细胞凋亡中 bax 和 bcl-2 蛋白的表达

3　讨论

细胞凋亡是有核细胞在凋亡诱导因素作用下通过一系列信号传导途径启动细胞内死亡机制,最终发生细胞程序性死亡的过程[4]。细胞凋亡广泛存在于心血管疾病病理变化中[5]。神经酰胺是神经鞘磷脂信号途径中重要的第二信使[1],介导了包括细胞分化、生长抑制、衰老和凋亡等多种生物学效应,其中凋亡作用是 1993 年 Obeid 等[6]发现在 U937 细胞中加入 C_2-ceramide 可以产生与 TNF-α 诱导的细胞凋亡相同的结果而发现的。bax 是 bcl-2 基因家族的成员,当其形成同源二聚体时促进细胞凋亡。bcl-2 基因过量表达则可与 bax 蛋白形成异二聚体,抑制 bax 同源二聚体的形成,从而抑制凋亡。bax 与 bcl-2 相互制约,在正常情况下二者保持一种平衡状态。因此,目前国内外大多数学者把细胞 bax/bcl-2 值作为判定细胞凋亡是否被抑制或加强的主要标志之一[7]。

本实验采用外源性 C_2-ceramide 作用于体外培养的血管内皮细胞,结果表明神经酰胺能诱导内皮细胞凋亡,且细胞凋亡率有时间-浓度-效应关系。神经酰胺能增强内皮细胞 bax mRNA 和 bax 蛋白的表达,降低 bcl-2 mRNA 和 bcl-2 蛋白的表达,故可以推测神经酰胺是通过上调 bax 的表达和下调 bcl-2 的表达,提高 bax/bcl-2 值来诱导细胞凋亡的,同时与文献[8-11]报道结果一致:神经酰胺激活 p53 使其发挥转录调节作用,抑制 bcl-2 的表达,启动 bax、p21 /wafl、GADD45 等 p53 下游基因的表达,增加凋亡。

神经酰胺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神经酰胺诱导人血管内皮细胞凋亡的效应及其机制,为进一步研究神经酰胺信号途径在血管内皮细胞凋亡中的作用提供实验依据。

参考文献:

[1] Ohanian J, Ohanian V. Sphingolipids in mammalian cell signalling [J]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58(14): 2053-2068.

[2] Ruvolo P P. Ceramide regulates cellular homeostasis via diverse stress signaling pathways [J]. Leukemia, 2001, 15 (8): 1153-1160.

[3] Madan B, Singh I, Kumar A, *et al*. Xanthones as inhibitors of microsomal lipid peroxidation and TNF-alpha induced ICAM-1 expression on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) [J]. Bioorg Med Chem, 2002, 10(11): 3431-3436.

[4] 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.

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

[6] Obeid L M, Linardic C M, Karolak L A, *et al*. Programmed cell death induced by ceramide [J]. Science, 1993, 259(5102): 1769-1771.

[7] Lee J U, Hosotani R, Wada M, *et al*. Role of Bcl-2 family proteins (Bax, Bcl-2 and Bcl-X) on cellular susceptibility to radiation pancreatic cancer cells [J]. Eur J Cancer, 1999, 35(9): 1374-1380.

[8] Kim S S, Chae H S, Bach J H, *et al*. p53 mediates ceramide-induced apoptosis in SKN-SH cells [J]. Oncogene, 2002, 21(13): 2020-2028.

[9] Kim H J, Mun J Y, Chun Y J, *et al*. Bax-dependent apoptosis induced by ceramide in HL-60 cells [J]. FEBS Lett, 2001, 505(2): 264-268.

[10] Yang H, Sadda M R, Li M, *et al*. S-adenosylmethionine and its metabolite induce apoptosis in HepG2 cells: Role of protein phosphatase 1 and Bcl-x(S) [J]. Hepatology, 2004, 40(1): 221-231.

[11] Horiuchi M, Hayashida W, Kambe T, *et al*. Angiotensin type 2 receptor dephosphorylates Bcl-2 by activating mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and induces apoptosis [J]. J Biol Chem, 1997, 272(30): 19022-19026.

(编辑　陈聪连)