文章编号:1000-5404(2009)22-2255-03

论著

尿毒症患者血清对内皮细胞凋亡的影响及 rhEPO 的干预作用

李小丽,甘 华,常晓东,杜晓刚 (重庆医科大学附属第一医院肾内科,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨尿毒症患者血清对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)凋亡的影响及重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rhEPO)的干预作用。**方法** 选择我院2008年12月至2009年4月收治的尿毒症患者和健康志愿者各10例,HUVECs按不同的干预方式分3组进行实验:对照组(含10%健康者血清)、尿毒症组(含10%尿毒症患者血清)、rhEPO干预组(rhEPO 5、10、15 U/ml,分别加入含有10%尿毒症患者血清的培养基)。各组干预24 h,TUNEL法检测细胞凋亡,比色法测定细胞内活性氧。**结果** 尿毒症患者血清环境中内皮细胞的凋亡指数和活性氧水平均高于对照组($P<0.01$)。rhEPO可抑制尿毒症患者血清诱导的内皮细胞凋亡($P<0.01$),降低细胞内活性氧水平($P<0.01$);随着rhEPO浓度的增加,内皮细胞凋亡指数和ROS水平都逐渐降低($P<0.05$)。相关分析显示:凋亡指数与活性氧水平呈正相关($r=0.89$,$P<0.01$)。**结论** 尿毒症患者血清可以诱导HUVECs凋亡,其机制可能与氧化应激有关。rhEPO可能通过减轻氧化应激反应而抑制尿毒症患者血清诱导的内皮细胞凋亡。

关键词:尿毒症;细胞凋亡;重组人促红细胞生成素;氧化应激
中图法分类号:R329.28;R331.1;R692.5 **文献标识码**:A

Effect of uremic serum on endothelial cell apoptosis and intervention of recombinant human erythropoietin in the process

LI Xiao-li, GAN Hua, CHANG Xiao-dong, DU Xiao-gang (Department of Nephrology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the effect of uremic serum on apoptosis in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and the intervention by recombinant human erythropoietin (rhEPO) in this process. **Methods** From Dec. 2008 to Apr. 2009, 10 uremic patients and 10 healthy volunteers were enrolled in this study. HUVECs were divided into 3 groups: control group (including 10% healthy serum medium), uremic group (including 10% uremic serum medium) and rhEPO treatment group (rhEPO at 5, 10 or 15 U/ml was added to 10% uremic serum medium). After 24 hous's intervention, cell apoptosis was evaluated by TUNEL assay, and reactive oxygen species were detected by colorimetry. **Results** HUVECs apoptosis index and ROS level were higher in the presence of uremic serum than those of healthy serum ($P<0.01$). With the addition of rhEPO (5,10 or 15 U/ml) in culture medium, the percentage of apoptotic cells and the production of ROS in HUVECs were inhibited ($P<0.01$). With rhEPO concentration increasing, apoptotic index and ROS level were decreasing gradually ($P<0.05$). Correlation analysis showed that there was positive correlation between apoptotic index and ROS level ($r=0.89$, $P<0.01$). **Conclusion** Uremic serum can induce HUVECs apoptosis, and the mechanism may be related to oxidative stress. Recombinant human EPO may inhibit endothelial cell apoptosis induced by uremic serum through alleviating oxidative stress.

Key words: uremia; cell apoptosis; recombinant human erythropoietin; oxidative stress

尿毒症患者动脉粥样硬化的发病率较一般人群明显升高。内皮细胞的凋亡在动脉粥样硬化的发生中起着重要的作用[1]。研究尿毒症患者动脉粥样硬化的发生是否与内皮细胞的凋亡有关,对进一步了解尿毒症患者心血管并发症的发生机制有一定的指导意义。

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)除用于纠正肾性贫血外,还广泛用于神经系统[2]和心血管系统[3]疾病的细胞保护。本实验通过模拟尿毒症患者内环境状态,研究尿毒症患者血清对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)凋亡的影响及重组人促红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rhEPO)的干预作用,以说明内皮细胞的凋亡在尿毒症患者心血管并发症中的作用以及rhEPO的保护作用。

作者简介:李小丽,女,湖北省枣阳市人,硕士研究生,主要从事慢性肾脏病方面的研究。电话:(023)89012613, E-mail: lixiaoli-cuite@163.com
通信作者:甘 华,E-mail:zxg0233@sina.com
收稿日期:2009-04-09;修回日期:2009-05-24

1 材料与方法

1.1 研究对象及材料

1.1.1 研究对象 选择2008年12月至2009年4月我院肾内科收治的尿毒症患者10例,原发病为慢性肾炎,均未用过EPO类药物,近1个月无急慢性感染、创伤、心肌梗死、心力衰竭、心律失常、严重营养不良及其他活动性疾病,未使用降脂药、铁剂及抗氧化剂。年龄24~73(46.30±16.38)岁。健康志愿者10例,年龄21~56(38.40±10.83)岁。研究对象均签署知情同意书。患者及健康志愿者性别、年龄的差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.1.2 试剂及仪器 DMEM培养基、胰蛋白酶(Gibco公司),胎牛血清(杭州四季青公司),活性氧测定试剂盒(南京凯基生物公司),TUNEL检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)。CKX41型倒置显微镜(日本Olympus),全自动全波长酶标仪(Thermo公司)。

1.2 方法

1.2.1 血清的制备 尿毒症患者和健康志愿者分别取清晨空腹静脉血4 ml,2 500×g离心20 min分离获取血清,分装保存于-20 ℃低温冰箱中,2周内待用。

1.2.2 内皮细胞培养及分组 HUVECs购自中国科学院上海细胞生物学研究所。细胞常规培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基,于37 ℃、5% CO_2培养箱内培养。HUVECs分3组进行实验:对照组(含10%健康者血清)、尿毒症组(含10%尿毒症患者血清)、rhEPO干预组(rhEPO 5、10、15 U/ml,分别加入含有10%尿毒症患者血清的培养基)。干预24 h后收集细胞,干预时间参考Imamura[4]及Szczepanski等[5]的研究,并由预实验获得。每次实验均采用同一代细胞,并用不同批次的细胞重复实验。

1.2.3 细胞形态学变化的观察 加入干预因素后24 h,倒置显微镜观察各组细胞形态。

1.2.4 比色法测定细胞内活性氧 HUVECs 2×10^4/ml接种于96孔培养板,置于37 ℃、5% CO_2培养箱内培养,待细胞长至90%以上融合后按上述分组。干预24 h后,弃上清,每孔加入200 μl蒸馏水,冰上吹打直至细胞溶解。每孔的200 μl细胞裂解液按活性氧测定试剂盒说明书检测,最后计算各孔细胞产生活性氧能力。每组、每个检测点设6个复孔,结果取平均值。

1.2.5 TUNEL法检测细胞凋亡 HUVECs 4×10^3/ml接种于含有8 mm×8 mm无菌盖玻片的24孔培养板,置于37 ℃、5% CO_2培养箱内培养,待细胞长至80%以上融合后按上述分组。干预24 h后的细胞爬片按试剂盒说明书制片,中性树胶封片,显微镜下观察,细胞核浓染成棕褐色者为阳性细胞,即凋亡的细胞。每组选3张片,每张片取5个视野进行计数,取平均值,为该片凋亡细胞数。

1.3 统计学分析

实验数据用Excel 2003及SPSS 11.5软件进行统计分析,计量资料采用$\bar{x}\pm s$表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用独立样本的t检验,两变量相关用直线相关回归分析。

2 结果

2.1 HUVECs的形态学变化

倒置显微镜观察,尿毒症组和rhEPO干预组细胞均有血管样结构形成,细胞膜边缘稍毛糙,细胞质内见较多颗粒;对照组细胞呈梭形或多角形,轮廓清晰,无血管样结构形成(图1)。

2.2 细胞内活性氧产生

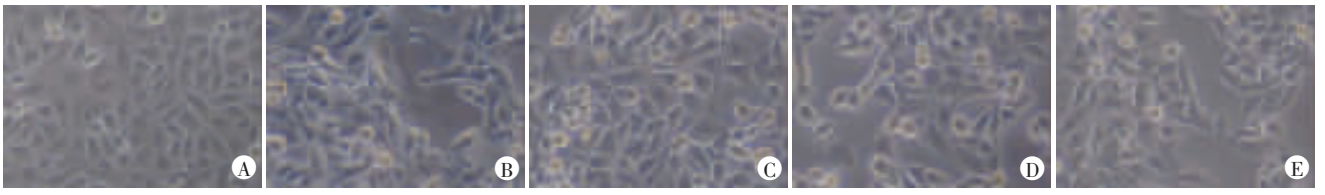
尿毒症组[(33.07±6.84)U/ml]及rhEPO干预组[分别为(26.96±4.63)、(22.54±4.56)、(18.45±3.19)U/ml]细胞内活性氧水平高于对照组[(6.30±1.51) U/ml],其差异有统计学意义($P<0.01$)。rhEPO干预组细胞内活性氧水平低于尿毒症组($P<0.05$),随着rhEPO浓度的增加,尿毒症患者血清培养的细胞内活性氧水平又逐渐降低($P<0.05$)。

2.3 TUNEL法测定细胞凋亡

尿毒症患者血清所诱导的内皮细胞凋亡指数高于正常对照组和rhEPO干预组($P<0.01$);随着rhEPO浓度的增加,尿毒症患者血清所诱导的内皮细胞凋亡指数又逐渐降低($P<0.05$,图2、3)。

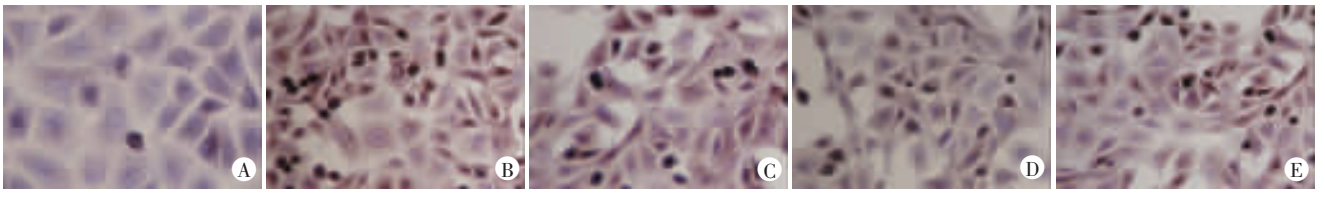
2.4 相关性分析

尿毒症患者血清诱导的内皮细胞凋亡指数与细胞内活性氧水平呈正相关($r=0.89$,$P<0.01$)。



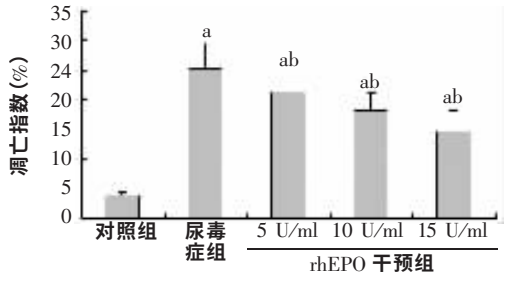
A:对照组; B:尿毒症组; C: 5 U/ml rhEPO干预组; D: 10 U/ml rhEPO干预组; E: 15 U/ml rhEPO干预组

图1 各组HUVEC干预24 h时的形态学变化 (倒置显微镜×100)



A:对照组; B:尿毒症组; C: 5 U/ml rhEPO干预组; D: 10 U/ml rhEPO干预组; E: 15 U/ml rhEPO干预组

图2 TUNEL法检测各组HUVECs的凋亡 (×200)



a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与尿毒症组比较

图 3　各组 HUVECs 的凋亡指数比较

3　讨论

心血管并发症是引起尿毒症患者死亡的主要原因[6]。Go 等[7]对 1996 – 2000 年的 112 029 例未行肾脏替代治疗的肾病患者的肾功能与心血管事件的发生率及患者的死亡率进行了系统、完整的纵向比较,发现肾小球滤过率(GFR)的下降程度与心血管事件的发生率呈明显的正相关。Anavekar 等对 14 527 名急性心肌梗死病人的肾小球滤过率进行了评估,发现随着 GFR 的下降,心肌再梗死、充血性心衰及心跳骤停等并发症明显增加。在 GFR 为 81 ml/min 以下时,GFR 每下降 10 ml/min,患者心血管事件的发生及死亡的危险度就增加 1.10。上述研究表明 GFR 的下降可以明显增加患者心血管事件的发生率和死亡率。

动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)是尿毒症患者主要的心血管并发症。血管内皮细胞的凋亡在动脉粥样硬化形成过程中可能发挥触发、维持与加速作用。已有研究表明内皮细胞的凋亡参与了糖尿病患者血管动脉粥样硬化的发生[8]。本实验通过体外以尿毒症患者血清刺激 HUVECs 模拟机体尿毒症血清内环境发现,经尿毒症患者血清刺激后,HUVECs 凋亡指数较对照组明显增加,表明了 HUVECs 的凋亡可能也参与了尿毒症患者动脉粥样硬化的发生。

尿毒症患者血清是通过何种机制引起内皮细胞的凋亡呢? 氧化应激可能在其中起着重要的作用。国外有学者通过分析内皮细胞在尿毒症血清和正常血清条件下的蛋白表达差异发现,在尿毒症血清刺激下,内皮细胞与氧化应激有关的蛋白(谷胱甘肽氧化酶和过氧化物歧化酶)表达明显增加[9]。本研究进一步证实,在尿毒症患者血清刺激下,HUVECs 内活性氧水平较对照组明显增加。

活性氧是线粒体氧化磷酸化系统的副产品,可对生物膜产生脂质过氧化作用,使生物膜受损,线粒体膜通透性增加,导致凋亡诱导因子释放而引起凋亡。本实验发现尿毒症组 HUVECs 凋亡时,其细胞内 ROS 产生明显高于对照组。相关分析也显示,HUVECs 凋亡指数与 ROS 水平呈正相关,这表明:尿毒症血清可以通过引起 HUVECs 的氧化应激反应而引起内皮细胞的凋亡。

尿毒症患者 EPO 治疗后心室肥厚明显减轻[10]。Siems 等[11]也发现 EPO 治疗可降低维持性血液透析患者的氧化应激水平。本实验在尿毒症患者血清中加入 rhEPO 后,HUVECs 内活性氧明显减少,同时凋亡细胞数较单纯尿毒症组明显减少,并且随着 rhEPO 浓度的增加,HUVECs 凋亡指数和 ROS 水平都逐渐降低。从而说明 rhEPO 可能通过减轻 HUVECs 氧化应激反应而抑制尿毒症患者 HUVECs 的凋亡。

本实验通过用尿毒症患者血清刺激 HUVECs,说明尿毒症患者血清可以诱导 HUVECs 的凋亡,其机制可能与氧化应激有关;rhEPO 则可能通过减轻细胞的氧化应激反应而抑制 HUVECs 的凋亡。但是具体机制及较高浓度的 rhEPO 的作用如何还需要进一步研究。

参考文献:

[1] Tedgui A, Mallat Z. Apoptosis, a major determinant of atherothrombosis[J]. Arch Mal Coeur Vaiss, 2003, 96(6): 671 – 675.

[2] Ehrenreich H, Aust C, Krampe H, *et al*. Erythropoietin: novel approaches to neuroprotection in human brain disease[J]. Metab Brain Dis, 2004, 19(3 – 4): 195 – 206.

[3] Moon C, Krawczyk M, Paik D, *et al*. Cardioprotection by recombinant human erythropoietin following acute experimental myocardial infarction: dose response and therapeutic window[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2005, 19(4): 243 – 250.

[4] Imamura R, Isaka Y, Ichimaru N, *et al*. Carbamylated erythropoietin protects the kidneys from ischemia-reperfusion injury without stimulating erythropoiesis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 353(3): 786 – 792.

[5] Szczepanski M, Kamianowska M, Wnuczko K, *et al*. Erythropoietin prevents oxidative stress and lipid peroxidation process in human umbilical vein endothelial cells induced by tumor necrosis factor alpha[J]. Pol Merkur Lekarski, 2006, 21(126): 534 – 539.

[6] Schiffrin E L, Lipman M L, Mann J F. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system[J]. Circulation, 2007, 116(1): 85 – 97.

[7] Go A S, Chertow G M, Fan D, *et al*. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization[J]. N Engl J Med, 2004, 351(13): 1296 – 1305.

[8] Nakagami H, Kaneda Y, Ogihara T, *et al*. Endothelial dysfunction in hyperglycemia as a trigger of atherosclerosis[J]. Curr Diabetes Rev, 2005, 1(1): 59 – 63.

[9] Carbo C, Arderiu G, Escolar G, *et al*. Differential expression of proteins from cultured endothelial cells exposed to uremic versus normal serum[J]. Am J Kidney Dis, 2008, 51(4): 603 – 612.

[10] Ayus J C, Go A S, Valderrabano F, *et al*. Effects of erythropoietin on left ventricular hypertrophy in adults with severe chronic renal failure and hemoglobin <10 g/dL[J]. Kidney Int, 2005, 68(2): 788 – 795.

[11] Siems W, Carluccio F, Radenkovic S, *et al*. Oxidative stress in renal anemia of hemodialysis patients is mitigated by epoetin treatment[J]. Kidney Blood Press Res, 2005, 28(5 – 6): 295 – 301.

(编辑　吴培红)