文章编号:1000-5404(2011)17-1851-03

论著

氢气对氧化低密度脂蛋白诱导的内皮细胞凋亡的抑制作用

祁 红[1,2],胡丽君[1] (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院心内科[1];610500 成都,成都医学院第一附属医院心内科[2])

[摘要] **目的** 探讨氢气(H_2)饱和培养液对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的内皮细胞凋亡的影响。**方法** 人脐静脉内皮细胞株 EA-hy926 分为:ox-LDL 组,ox-LDL + 不同浓度 H_2 组和正常对照组;流式细胞仪检测细胞凋亡率和细胞内 ROS 水平;Western blot 检测 NF-κB p65 蛋白水平。**结果** ox-LDL + H_2 组(氢浓度 0.6 mmol/L)与 ox-LDL 组相比,细胞凋亡率明显降低[(2.48 ± 0.21)% *vs* (4.01 ± 0.39)%, $P<0.01$],细胞内 ROS 含量减少[(2.05 ± 0.22) *vs* (5.32 ± 1.04), $P<0.01$], NF-κB p65 蛋白水平降低[(0.29 ± 0.02) *vs* (0.66 ± 0.07), $P<0.01$],且上述作用随 H_2 浓度增加而增强。**结论** H_2 饱和培养液可减少 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡,其机制可能与减少 ROS 含量和抑制 NF-κB 激活有关。

[关键词] 氢气;氧化低密度脂蛋白;活性氧;血管内皮细胞;凋亡
[中图法分类号] R322.12; R329.25; R543.502 [文献标志码] A

Inhibitory effects of hydrogen on apoptosis in endothelial cells induced by oxidized low density lipoprotein

Qi Hong[1,2], Hu Lijun[1] ([1] Department of Cardiology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014; [2] Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan Province, 610500, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of hydrogen (H_2)-rich culture fluid on apoptosis in endothelial cells induced by oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL). **Methods** Endothelial cells from human umbilical veins were divided into control group, ox-LDL group, and H_2 group (ox-LDL + H_2-rich fluid). Apoptosis of endothelial cells and level of intracellular reactive oxygen species (ROS) were assayed by flow cytometry. NF-κB p65 protein was detected by Western blotting. **Results** The apoptosis rate of endothelial cells, intracellular ROS level, and NF-κB p65 protein level were significantly lower in ox-LDL group than in 0.6 mmol/L H_2 group (2.48% ± 0.21% *vs* 4.01% ± 0.39%, 2.05 ± 0.22 *vs* 5.32 ± 1.04, 0.29 ± 0.02 *vs* 0.66 ± 0.07, $P<0.01$), which increased with the increasing H_2 concentration in culture fluid. **Conclusion** H_2-rich fluid can protect endothelial cells against ox-LDL-induced apoptosis by reducing intracellular ROS level and inhibiting NF-κB activation.

[**Key words**] hydrogen; oxidized LDL; reactive oxygen species; vascular endothelial cell; apoptosis

Corresponding author: Hu Lijun, Tel: 86-23-84555321, E-mail: hulijuncqykdx@163.com

血管内皮损伤是促进动脉粥样硬化的发生、发展的重要使动因素之一[1]。氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)被认为是内皮损伤的重要危险因子之一。ox-LDL 可以通过促进内皮细胞氧化应激,促进内皮细胞凋亡和功能下降[2],由于 ox-LDL 在体内难以清除,如何拮抗 ox-LDL 对内皮的氧化损伤作用成为研究的热点。新近研究[3]发现,分子氢(H_2)可以在生物体内发挥抗氧化作用[3],但 H_2 对 ox-LDL 诱导的内皮细胞氧化损伤是否有影响目前尚不清楚。因此,我们假设 H_2 饱和培养液可能对 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡具有保护作用,期望为冠心病的防治提供新的思路。

[通信作者] 胡丽君,电话:(023)84555321,E-mail: hulijuncqykdx@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) EA-hy926 购自美国 lonza 公司;低密度脂蛋白(ox-LDL)、DCF-DA 购自美国 sigma 公司;胎牛血清和 DMEM-F12 培养基购自美国 Hyclon 公司;Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒购自南京凯基公司;NF-κB p65 及 GAPDH 抗体购自美国 santa cruz 公司。H_2 饱和培养液按文献[3]所述方法配制:将 H_2 加入 250 ml 预注了 DMEM-F12 培养液的软袋中,以 0.4 MPa 加压 4 h 后,抽出袋内气体,重新注入 H_2 加压 1 次,此法制成的 H_2 饱和 PBS 中 H_2 浓度可达 0.6 mmol/L 以上。通过调整 H_2 饱和培养液和普通培养液的比例制成需要的含 H_2 终浓度。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及实验分组 EA-hy926 用含 10% 胎牛血清和双抗(青霉素 100 U/ml,链霉素 100 μg/ml)的 DMEM-F12

培养基，37 ℃、5% CO_2孵箱培养。按不同处理方法分为：①ox-LDL组（终浓度100 mg/L的ox-LDL）；②ox-LDL + H_2组（终浓度为100 mg/L的ox-LDL和H_2饱和培养液培养），其中按含氢量不同分为（0.1、0.3、0.6 mmol/L）3个亚组，加氢组每4小时更换H_2饱和培养液1次，以保证培养液中达到需要的氢浓度[3]；③正常对照组。各组共培养72 h后进行各项指标检测。

1.2.2　细胞内活性氧水平检测　以DCF-DA作为荧光探针，流式细胞仪（FACS）检测各组细胞荧光强度。将未加DCF-DA的阴性对照的自发荧光强度值定义为1，待测组的荧光强度值为检测荧光强度/阴性对照荧光强度。取各组处理后细胞，加5 ml无血清培养基和5 μl DCF-DA到50 ml培养瓶中，37 ℃，5% CO_2孵育60 min；PBS清洗后以0.25%胰酶消化，胎牛血清终止消化后PBS再次清洗，用1 ml无血清培养基重悬细胞。其中阳性对照组加阳性药物Rosup 5 μl，常温下孵育1 h，PBS冲洗3次后，FACS检测待测管荧光强度即代表细胞内ROS含量。

1.2.3　细胞凋亡检测　取各组对数生长期细胞，0.25%胰酶消化，PBS清洗2次，计数细胞后以500 μl结合缓冲液重悬，制成细胞浓度1×10^6个/ml的单细胞悬液。取100 μl细胞悬液于5 ml流式管中，加入5 μl Annexin V-FITC和10 μl 20 μg/ml的碘化丙锭（PI）溶液，混匀后室温避光孵育15 min，在反应管中加400 μl PBS，FACS分析检测Annexin V + 细胞比例即为凋亡率。

1.2.4　Western blot检测NF-κB p65蛋白　按王勇等[4]的方法提取核蛋白。将蛋白提取物与十二烷基磺酸钠（SDS）上样缓冲液按1∶1比例混合后，取蛋白样品20 μg上样，依次行SDS-PAGE电泳（浓缩胶电压60 V，分离胶120 V）、半干转膜（2～2.5 h），转膜后用TBST缓冲液与50 g/L脱脂奶粉封闭2 h；封闭后加入NF-κB p65一抗（抗体稀释浓度1∶200），4 ℃孵育过夜后，洗膜2次，与辣根过氧化物酶结合的二抗孵育1 h，然后用化学发光试剂盒检测杂交信号。实验中以GAPDH作为内参，Quantity One图像分析软件分析条带灰度×面积值。

1.3　统计学方法

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件。3组间均数比较采用单因素方差分析。

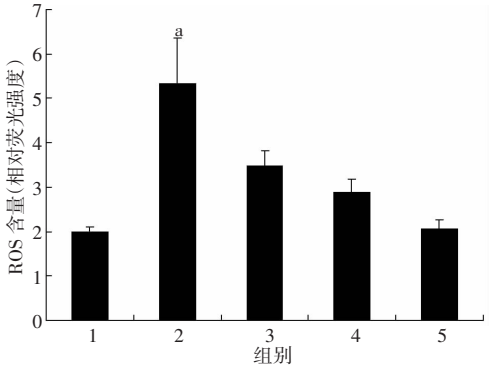
2　结果

2.1　H_2饱和PBS保护ox-LDL诱导的内皮细胞凋亡

流式检测细胞凋亡，发现ox-LDL组细胞凋亡率明显高于正常对照组[(23.24 ± 2.56)% *vs* (2.48 ± 0.21)%，$P<0.01$]，但ox-LDL + 不同浓度H_2（0.1、0.3、0.6 mmol/L）组细胞凋亡率均较ox-LDL组明显降低，H_2可浓度依赖性的降低细胞凋亡率，其中ox-LDL + H_2（0.6 mmol/L）组凋亡率与最低，仅为正常对照组的1.6倍[(4.01 ± 0.39)% *vs* (2.48 ± 0.21)%，$P<0.01$]（图1）。

2.2　H_2饱和PBS降低内皮细胞内ROS生成

与对照组比较，ox-LDL组细胞内ROS含量明显增多[(5.32 ± 1.04) *vs* (1.98 ± 0.13)，$P<0.01$]；但ox-LDL + 不同浓度H_2（0.1、0.3、0.6 mmol/L）组细胞内ROS含量较ox-LDL组均明显减少，H_2可降低细胞内ROS，呈浓度依赖性。其中ox-LDL + H_2（0.6 mmol/L）组ROS含量最低，与正常对照组无统计学差异[(2.05 ± 0.22) *vs* (1.98 ± 0.13)，$P>0.05$]（图2）。

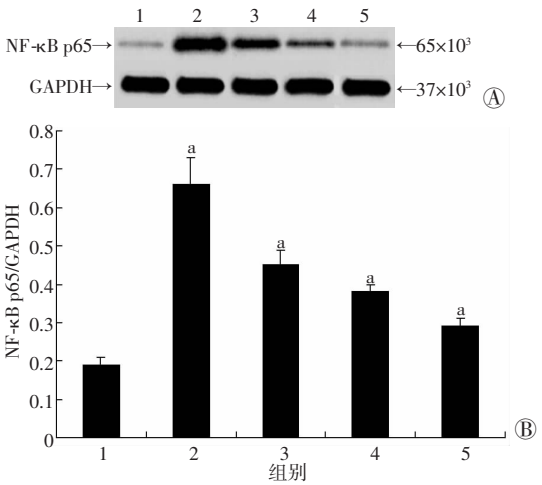


1：正常对照组；2：ox-LDL组；3：Ox-LDL + H_2（0.1 mmol/L）组；4：Ox-LDL + H_2（0.3 mmol/L）组；5：Ox-LDL + H_2（0.6 mmol/L）组
a：$P<0.01$，与正常对照组比较

图2　各组内皮细胞内ROS含量比较

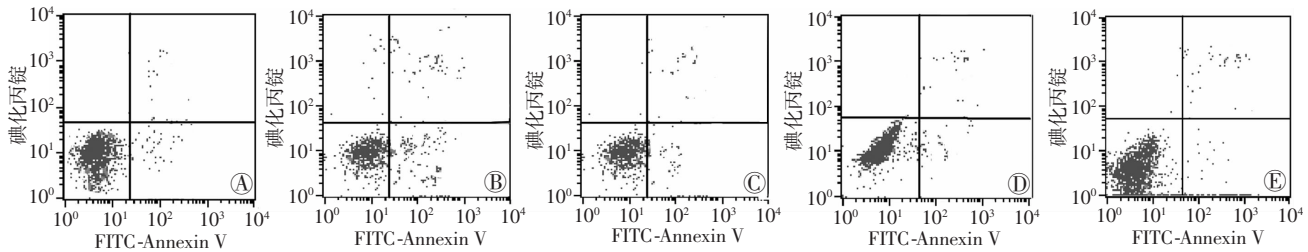
2.3　H_2饱和PBS抑制ox-LDL诱导的NF-κB激活

ox-LDL组NF-κB p65蛋白含量明显高于对照组[(0.66 ± 0.07) *vs* (0.19 ± 0.02)，$P<0.01$]；ox-LDL + 不同浓度H_2（0.1、0.3、0.6 mmol/L）组，NF-κB p65蛋白含量明显减少，且呈浓度依赖性（图3）。



1：正常对照组；2：ox-LDL组；3：Ox-LDL + H_2（0.1 mmol/L）组；4：Ox-LDL + H_2（0.3 mmol/L）组；5：Ox-LDL + H_2（0.6 mmol/L）组
A：电泳结果；B：半定量分析　a：$P<0.01$，与正常对照组比较

图3　Western blot检测各组NF-κB p65蛋白含量



A：正常对照组；B：ox-LDL组；C：Ox-LDL + H_2（0.1 mmol/L）组；D：Ox-LDL + H_2（0.3 mmol/L）组；E：Ox-LDL + H_2（0.6 mmol/L）组

图1　流式细胞仪检测内皮细胞凋亡分析

3 讨论

本研究发现,ox-LDL组细胞凋亡率明显高于ox-LDL + H_2组,且H_2浓度增加凋亡率逐渐降低,提示,H_2饱和培养液可以保护ox-LDL诱导的内皮细胞凋亡。加入H_2后ox-LDL组内皮细胞的细胞内ROS水平和NF-κB水平均明显降低,且与H_2浓度呈剂量依赖性,提示H_2可能通过降低细胞ROS水平,从而抑制NF-κB激活来发挥凋亡保护作用。

ox-LDL是血浆中的LDL经氧化修饰而产生的,是冠心病的重要危险因素之一[5],具有明显的内皮细胞毒性。本实验发现:ox-LDL可促进内皮ROS生成,诱导内皮细胞凋亡。既往研究报道,ox-LDL可选择性作用于细胞周期的S期,诱导细胞凋亡[6]。本研究中虽没有对ox-LDL诱导内皮凋亡的途径进行探讨,但发现ox-LDL可以增加内皮细胞ROS水平,提示ox-LDL可能通过氧化损伤作用诱导血管内皮细胞凋亡。因此,通过干预氧化损失环节有可能拮抗ox-LDL的凋亡诱导作用。

本研究中选用H_2饱和PBS拮抗ox-LDL对细胞的氧化损伤作用,结果发现H_2饱和PBS可以剂量依赖性地降低内皮细胞内ROS含量,最终导致细胞凋亡率明显降低。因为,众所周知,氧化应激中产生的ROS,包括强氧化性的羟自由基(·OH)和过氧化亚硝酸阴离子($ONOO^-$),还有中度或弱氧化性的一氧化氮(NO)、超氧阴离子(O_2^-)等。其中强氧化性自由基能破坏具有重要功能的生物大分子的结构和功能,加重内皮氧化损伤,通常被认为是有害自由基。而NO、O_2^-等则被认为对内皮细胞具有保护作用,是有益的氧自由基。传统抗氧化剂在拮抗有害自由基的同时,也消耗了有益自由基的含量,破坏了机体自身的自由基平衡[7]。同时,它们在对抗氧自由基的过程中的中间产物本身就是新的有害自由基。但近期有研究[3]发现,H_2可通过细胞膜等膜性结构,特异性中和细胞内的·OH和$ONOO^-$,可拮抗氧化应激,同时又不破坏机体正常的自由基平衡[3]。动物实验也证明,吸入H_2或口服含氢生理盐水在肝缺血再灌注损伤后有明确的保护作用[8],还可以减少低密度脂蛋白的氧化修饰,延缓$apoE^{-/-}$小鼠粥样硬化发展[9]。提示,H_2保护ox-LDL诱导的内皮细胞凋亡,很可能与其中和ROS中强氧化性的自由基有关。

我们还发现H_2可以减少ox-LDL诱导的NF-κB p65蛋白增加,并且作用也呈剂量依赖性。NF-κB是氧化应激敏感的转录因子。通常,NF-κB以无活性状态存在于胞质中,氧化应激后,活化的NF-κB进入细胞核,通过调节增殖、凋亡相关基因的转录发挥其生物学作用。NF-κB p65是活化的NF-κB的功能亚单位之一,可启动多种促炎症细胞因子、黏附分子、趋化因子等的基因转录,从而参与机体防御功能和炎症反应。NF-κB存在于内皮细胞,对血管内皮炎症因子表达起关键调控作用。因此,抑制NF-κB活性,可能成为控制血管炎症、延缓和改善动脉粥样硬化进展的关键途径[10]。结合本研究结果,提示H_2可能具有抑制ox-LDL诱导的NF-κB激活的作用。但这一作用是否为H_2保护凋亡的机制还需进一步验证。

综上所述,体外实验中,H_2可保护ox-LDL诱导的内皮细胞凋亡,其机制可能与减少ROS产生和抑制NF-κB激活有关。

参考文献:

[1] Satoh K, Nigro P, Berk B C. Oxidative stress and vascular smooth muscle cell growth: a mechanistic linkage by cyclophilin A[J]. Antioxid Redox Signal, 2010, 12(5): 675-682.

[2] Koba S, Hirano T. Dyslipidemia and atherosclerosis [J]. Nippon Rinsho, 2011, 69(1): 138-143.

[3] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, *et al*. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals[J]. Nat Med, 2007, 13(6): 688-694.

[4] 王勇, 黄文华. 一种改进的核转录因子的电泳迁移率改变分析法[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(1): 119-120.

[5] Salvayre R, Auge N, Benoist H, *et al*. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1585(2/3): 213-221.

[6] Sawamura T, Kume N, Aoyama T, *et al*. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein[J]. Nature, 1997, 386(6620): 73-77.

[7] 刘志恒, 禹晓东, 王海强, 等. 维生素C与小剂量激素联用对急性脊髓缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(8): 814-818.

[8] Cai J, Kang Z, Liu W W, *et al*. Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model[J]. Neurosci Lett, 2008, 441(2): 167-172.

[9] Ohsawa I, Nishimaki K, Yamagata K, *et al*. Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 377(4): 1195-1198.

[10] Ceolotto G, Gallo A, Papparella I, *et al*. Rosiglitazone reduces glucose-induced oxidative stress mediated by NAD(P)H oxidase *via* AMPK-dependent mechanism [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(12): 2627-2633.

(**收稿**:2011-03-15;**修回**:2011-04-27)

(编辑 王 红)