

小干扰RNA下调cyclophilin-D蛋白表达对内皮细胞抗氧化损伤的作用☆

彭江洲¹, 杨艳旗², 陈 炬², 陈柏深¹, 薛 雷¹

Effect of small interfering RNA down-regulated Cyclophilin-D protein expression against oxidative injury to endothelial cells

Peng Jiang-zhou¹, Yang Yan-qi², Chen Ju², Chen Bo-shen¹, Xue Lei¹

Abstract

BACKGROUND: Cyclophilin-D protein in the mitochondrial matrix plays a special role in the process of mitochondrial damage. Correlation between Cyclophilin-D protein and vascular endothelial cell function, as well as Cyclophilin-D protein effects on atherosclerosis and vascular stenosis are still unclear.

OBJECTIVE: To investigate the relationship between Cyclophilin-D expression and oxidative stress damage to endothelial cells by small interfering RNA (siRNA)-mediated gene silencing.

METHODS: ECV304 cells were cultured in phosphate buffered saline containing 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 . siRNA silenced ppif gene was used to establish Cyclophilin-D deficiency models. The blank group was treated with phosphate buffered saline. Apoptotic rate of ECV304 cells was detected by flow cytometry; meanwhile, morphological changes were observed by electron microscope.

RESULTS AND CONCLUSION: The apoptotic rate of ECV304 cells was (32.51 \pm 6.6)% in the Cyclophilin-D deficiency group, significantly lower than (52.57 \pm 5.84)% in the H_2O_2 group ($P=0.001$). The electron microscope results showed that the number of apoptotic cells in the Cyclophilin-D deficiency group was decreased significantly as compared with the H_2O_2 group, and the morphological changes in the former group were slighter than that were characterized as early apoptosis. Cyclophilin-D is a key protein to vascular endothelial cells against oxidative stress injury.

Peng JZ, Yang YQ, Chen J, Chen BS, Xue L. Effect of small interfering RNA down-regulated Cyclophilin-D protein expression against oxidative injury to endothelial cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(15): 2805-2810. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 线粒体基质中的 Cyclophilin-D 蛋白(CypD)在线粒体损伤过程中起着特殊作用。目前对于 CypD 蛋白与血管内皮细胞功能的关系, 以及 CypD 蛋白在动脉粥样硬化和血管狭窄发生、发展中的作用仍未明确。

目的: 观察小干扰 RNA 基因沉默对内皮细胞 CyPD 蛋白表达及氧化应激损伤、凋亡的影响。

方法: 采用含 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的 PBS 液处理 ECV304 细胞, 小干扰 RNA 沉默 ppif 基因以建立 CyPD 蛋白缺陷型细胞凋亡模型, 空白对照组以单纯 PBS 液处理。流式细胞仪检测 ECV304 细胞凋亡率, 电镜观察细胞超微结构。

结果与结论: CyPD 缺陷模型组细胞凋亡率为(32.51 \pm 6.6)%, 明显低于 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组(52.57 \pm 5.84)%, $P=0.001$ 。电镜观察结果显示, CyPD 缺陷型细胞模型组细胞凋亡数量明显较 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组减少, 形态改变也较轻, 多为早期凋亡特征。提示下调 CyPD 蛋白水平可明显减轻血管内皮细胞氧化应激损伤和凋亡。

关键词: 内皮细胞; 氧化应激; RNA 干扰; cyclophilin-D 蛋白; 线粒体缩

缩略语注释: siRNA: small interfering RNA, 小干扰 RNA
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.15.032

彭江洲, 杨艳旗, 陈炬, 陈柏深, 薛雷. 小干扰 RNA 下调 cyclophilin-D 蛋白表达对内皮细胞抗氧化损伤的作用[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(15): 2805-2810. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

血管内皮细胞是抵御各种应激因子的第一道防线, 内皮细胞损伤不可避免地引起血管功能障碍。有资料表明, 几乎所有已知的导致冠状动脉粥样硬化性心脏病的危险因素都与内皮功能失常相关联。这些危险因素包括高血压、高血脂、吸烟、糖尿病、动脉粥样硬化家族史、高龄等传统危险因素^[1], 以及近年发现的新的危险因素, 如饮食中缺少抗氧化剂, 体内铁贮存增多^[2], 存在胰岛素抵抗, 血管紧张素转换酶基因过度表达, 血中一些凝血因子增高, 血中同型半胱氨酸增高, 硫化氢内稳态的失衡等^[3-4]。

内皮功能失常就像一座桥梁一样, 各种危险因素通过它导致和恶化了心血管疾病。引起内皮功能失常的机制尚未完全明了, 上述的心血管危险因素, 均与氧化应激的增强和活性氧的产生过量有关, 这两者均可降低血管一氧化氮的生物学活性, 引起细胞损害^[5]。许多研究表明, 活性氧的过度蓄积是内皮细胞损伤的主要原因^[6-7]。

线粒体是细胞内产生活性氧的主要场所, 也是氧化损伤的靶点。Cyclophilin-D 蛋白(CyPD)是线粒体通透性转换孔的组成部分, 其编码基因是 ppif。线粒体对氧化应激及巯基制剂的反应之一, 就是腺核苷酸移位酶与 CyPD 相结合^[8]。已有研究表明, 去除 CyPD 的心肌细胞对

¹Department of Cardiothoracic Surgery, the Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China; ²Department of Cardiothoracic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China

Peng Jiang-zhou☆, Doctor, Attending physician, Department of Cardiothoracic Surgery, the Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China jiangzhou83@163.com

Corresponding author: Yang Yan-qi, Professor, Doctoral supervisor, Department of Cardiothoracic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, Guangdong Province, China yangyanqisw@163.com

Received: 2011-11-03
Accepted: 2012-01-17

¹南方医科大学第三附属医院胸心外科, 广东省广州市 510630; ²中山大学附属第二医院胸心外科, 广东省广州市 510120

彭江洲^{*}, 男, 1975年生, 湖南省吉首市人, 土家族, 2009年中山大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事冠心病的综合治疗。
jiangzhou83@163.com

通讯作者, 杨艳旗, 教授, 博士生导师, 中山大学附属第二医院胸心外科, 广东省广州市 510120
yangyanqisw@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2012)15-02805-06

收稿日期: 2011-11-03
修回日期: 2012-01-17
(20111012025/G·W)

氧化应激、钙超载等诱导的细胞死亡的易感性明显下降, 相关的凋亡蛋白合成也明显减少^[9]。但对于CyPD与血管内皮细胞功能的关系, 以及CyPD在动脉粥样硬化和血管狭窄的发生、发展中的作用仍未明了。在以往研究基础上, 作者假设CyPD是内皮细胞氧化损伤的关键蛋白, 利用小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)沉默ppif基因, 下调内皮细胞CyPD蛋白表达, 探讨CyPD与血管内皮细胞氧化损伤的关系及机制。

1 材料和方法

设计: 细胞学水平, 对比观察实验。

时间及地点: 于2008-03/2009-05在中山大学附属第二医院医学研究中心完成。

材料:

细胞、试剂及仪器:

细胞、试剂及仪器	来源
人脐静脉内皮细胞株 ECV304	武汉大学典藏中心
Nikon eclipse TE 2000U 荧光显微镜	中山二院医学研究中心
日立 H-7500 透射电镜	中山大学医学院电镜室
FA Sort 流式细胞仪	BD 公司
CELL Quest 分析软件、Rotor-Gene 6000 反转录-聚合酶链反应仪、Lipofectamine 2000	Invitrogen 公司
高糖型 DMEM、胎牛血清	Gibco 公司
体积分数 30% H ₂ O ₂	Sigma 公司
Anti-cyclophilin-D Antibody	Bioreagents 公司
Annexin V-FITC kit 试剂盒	Bender MedSystems 公司
siRNA	上海吉玛生物公司

方法:

建立内皮细胞凋亡模型: 将生长良好的 ECV304 细胞接种于 6 孔板中, 每孔细胞数 1×10^6 个, 分为 A、B 两组, 每组重复 3 次。500 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 处理组用含 500 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 的 PBS 液 1 mL 处理, 置于体积分数 5% CO₂ 培养箱中, 在 37 °C、饱和湿度下分别培养 0, 30, 60, 90 和 120 min, 换普通含体积分数 10% 胎牛血清的高糖型 DMEM 培养基继续培养 24 h。空白对照组用单纯 PBS 液处理, 方法同上^[10]。

检测指标及方法: ①两组达预期培养时间后, 消化细胞连同上清培养液一起 1 000 r/min 离心 5 min, 用 PBS 洗 1 次, 相同转速及时间再

离心 1 次, 弃上清, 沉淀用 Annexin V-FITC kit 试剂盒处理后流式细胞仪检测细胞凋亡率。②按氧化应激的 5 个时间点提取 A 组细胞总 RNA, 用实时定量-反转录-聚合酶链反应方法检测 ppif 基因的表达水平。③按氧化应激时间提取细胞总蛋白, western blot 法检测 CyPD 蛋白表达量的变化。

建立 CyPD 缺陷型细胞凋亡模型: ppif 基因的 siRNA 由上海吉玛生物公司合成, 其双链的基因序列为: Sense 5'-GCC GCU UUC CUG ACG AGA ATT-3', Anti-sense 5'-UUC UCG UCA GGA AAG CGG CTT-3'。将 ECV304 细胞按 1×10^5 /孔接种于 6 孔板中培养 24 h, 待细胞生长致融合 70% 时, 用 Lipofectamine 2000 按其说明上推荐的步骤, 将 siRNA 转染进 ECV304 细胞, 6 h 后用荧光显微镜和流式仪进行转染率的检测, 并更换为普通培养基继续培养 12, 24, 48, 72 h。实时定量-反转录-聚合酶链反应方法检测 ppif 的沉默效率, Western blot 法检测 CyPD 蛋白表达。选用沉默率最高的时间点作为 CyPD 缺陷型细胞模型组。500 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 处理组及 CyPD 缺陷型细胞模型组细胞(每组重复 5 次)用 500 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 培养 120 min, 更换普通培养基再培养 24 h, 待流式检测细胞凋亡率^[11]。

电镜观察细胞超微结构: 各组细胞培养 24 h 后, 用细胞刮子将细胞刮下, 连同细胞培养液一起以 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 收集细胞于 1.5 mL EP 管内, 2.5% 戊二醛固定及 1% 锇酸固定, 梯度丙酮脱水, 环氧树脂 812 包埋, 半薄切片定位, AO 超薄切片 700 nm 厚度, 醋酸铀、柠檬酸铅双重染色后透射电镜观察。

主要观察指标: ① ECV304 细胞凋亡率。② CyPD 蛋白及 ppif 基因表达。③ CyPD 缺陷型细胞凋亡率。④ 细胞超微结构。

统计学分析: 由第一作者采用 SPSS 13.0 软件进行重复测量数据的方差分析、双变量相关分析及均数检验, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 ECV304 细胞凋亡率 重复测量数据的方差分析显示, 500 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 处理组、空白对照组 ECV304 细胞凋亡率的差异有显著性意义 ($P = 0.001$), 见表 1。均数检验示, 500 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 处理组内不同时间凋亡率差异有显著性意义 ($P < 0.05$), Pearson 相关分析示, 凋亡率

与H₂O₂作用时间呈显著正相关($r=0.982$, $P < 0.001$)。

表 1 空白对照组、500 μmol/L H₂O₂ 处理组不同作用时间下 ECV304 细胞凋亡率比较
Table 1 Apoptotic rate of ECV304 cells apoptosis in the blank control and H₂O₂ groups at different time (x±s, %)

Time	500 μmol/L H ₂ O ₂	Blank control
0 min	3.66±1.51	3.41±0.80
30 min	14.04±0.65	7.12±1.55
60 min	20.67±2.62	4.78±0.31
90 min	35.09±4.45	8.10±2.32
120 min	47.14±11.06	7.41±2.42

Repeat measured data analysis of variance regarding the apoptotic rates between the two groups indicated $P=0.001$

2.2 CyPD蛋白及ppif基因表达 正常ECV304细胞中CyPD蛋白的相对分子质量约为20 000。在500 μmol/L H₂O₂处理组, 随着氧化应激时间延长, CyPD蛋白表达和ppif基因表达逐渐增加。30, 60, 90和120 min时间点的ppif基因表达量分别为0 min的2.19, 2.48, 2.36和1.64倍($P < 0.05$), 见图1, 2。

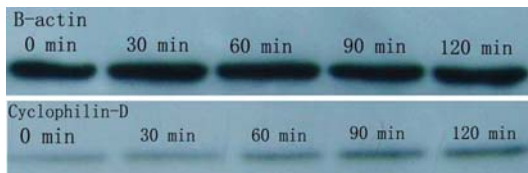


Figure 1 Changes of Cyclophilin-D protein expression following oxidative stress in the 500 μmol/L H₂O₂ group

图 1 500 μmol/L H₂O₂ 处理组 CyPD 蛋白表达随氧化应激时间的变化

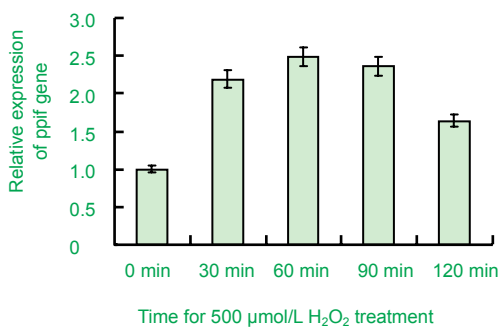


Figure 2 Changes of ppif gene relative expression following oxidative stress in the 500 μmol/L H₂O₂ group

图 2 500 μmol/L H₂O₂ 处理组不同时间 ppif 基因相对表达水平(以处理前为对照)

2.3 CyPD缺陷型细胞凋亡率 SiRNA的转染效果见图3, 流式检测转染率为(97.96±0.31)%, 实时定量-反转录-聚合酶链反应结果表明, ppif的沉默效率在转染后的48 h最高, 见图4; 后续的CyPD缺陷型细胞模型组细胞均为转染后48 h的细胞。SiRNA转染后western blot检测结果, CyPD蛋白表达随转染时间延长而逐渐减弱,

见图5。500 μmol/L H₂O₂处理组、CyPD缺陷型细胞模型组细胞凋亡率分别为(52.57±5.84)%和(32.51±6.6)%, 差异有非常显著性意义($P=0.001$), 见图6。

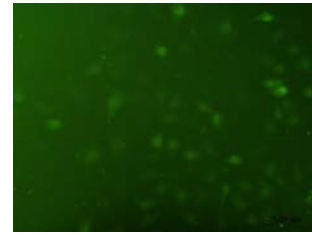


Figure 3 ECV304 cells at 6 h after small interfering RNA transfection (FAM-siRNA transfection) under fluorescence microscope (x200)

图 3 小干扰 RNA 转染 6 h 后的 ECV304 细胞(用 Lipofectamine2000 与荧光对照序列 FAM-siRNA-转染试剂混和转染, 荧光显微镜, x200)

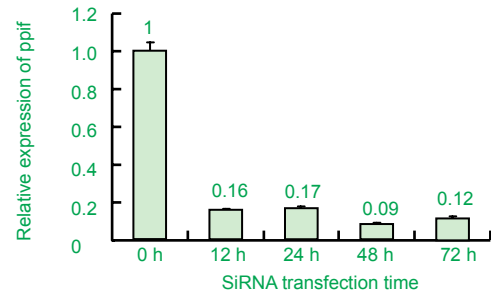


Figure 4 Silence efficiency of ppif gene

图 4 ppif 的沉默效率(以处理前为对照)



Figure 5 Changes of Cyclophilin-D protein expressed follow small interfering RNA transfection

图 5 小干扰 RNA 转染后, CyPD 蛋白表达随时间变化

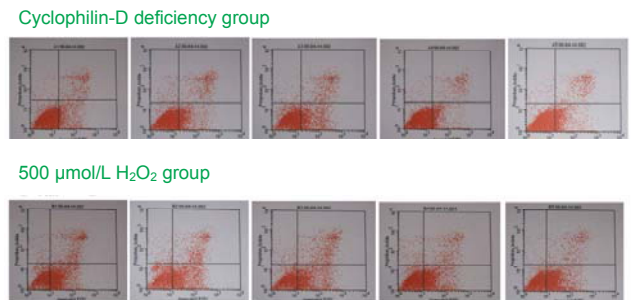


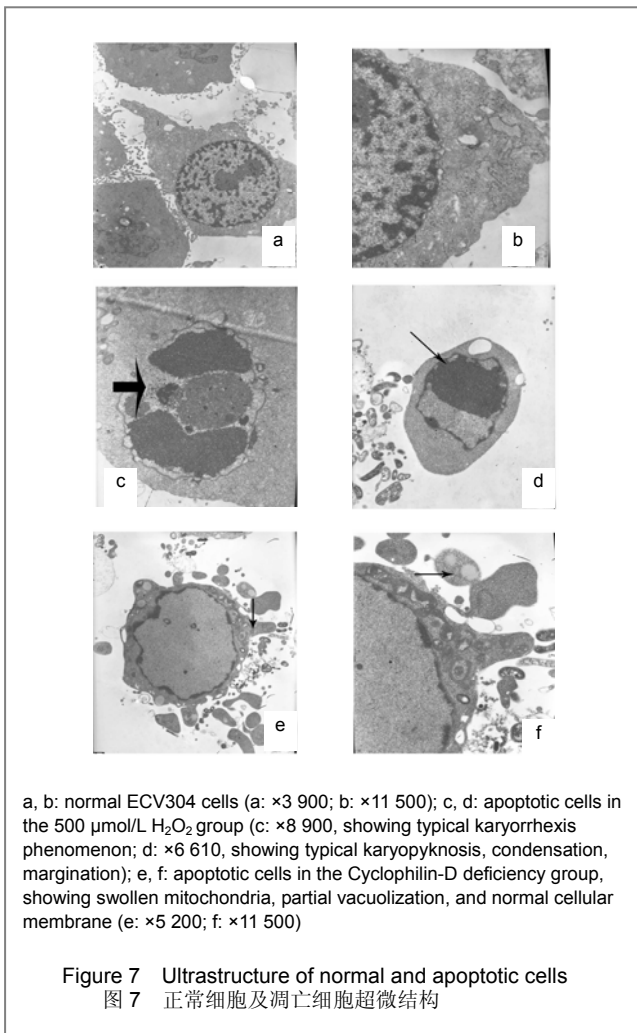
Figure 6 Apoptotic results of Cyclophilin-D deficiency and 500 μmol/L H₂O₂ groups detected by a flow cytometer

图 6 CyPD 缺陷型细胞模型组、500 μmol/L H₂O₂ 处理组细胞凋亡流式检测结果

2.4 细胞超微结构 透射电镜观察细胞超微结构显示, 空白对照组以正常细胞为主, 很少见凋亡, 见图7a, b。

500 μmol/L H₂O₂处理组ECV304细胞出现明显凋亡样改变, 凋亡细胞很多, 细胞微绒毛减少, 大多数细胞核碎裂, 可见典型核染色质浓集, 分布于核膜周边, 线粒体高度肿胀, 细胞器高度破坏并出现较多空泡, 部分仅见细胞轮廓, 见图7c, d。

而CyPD缺陷型细胞模型组中, 细胞凋亡数量明显较500 μmol/L H₂O₂处理组减少, 形态改变也较轻, 多为早期凋亡特征, 线粒体肿胀成球形, 细胞膜正常, 见图7e, f。



3 讨论

目前普遍认为, 内皮细胞功能失常和凋亡在动脉粥样硬化的发生发展中起关键作用。动脉粥样硬化的危险因素常伴有活性氧过度蓄积^[7], 活性氧的过度释放将促进白细胞黏附、血栓形成、炎症、细胞增殖和血管张力增加, 随后引发血管病变。线粒体是细胞氧化应激的靶

点, 也是产生内源性活性氧的场所。过度的氧化应激会导致线粒体的损伤, 进而导致血管内皮细胞功能失常^[12]。另外, 血管并发症常常发生在有线粒体疾病的青年人中, 他们缺乏公认的动脉粥样硬化危险因素, 但常有内皮细胞功能障碍^[13]。因此, 线粒体被认为是连接危险因素、氧化损伤和内皮细胞功能障碍的重要环节, 也是促进动脉粥样硬化病变形成的和发展的的重要因素^[14]。通过对人主动脉标本及鼠早期动脉粥样硬化模型的研究, 有学者提出线粒体DNA损害是动脉粥样硬化病变的早期事件^[15]。

活性氧引起线粒体的损害是通过增加线粒体DNA的损害, 减少线粒体RNA的转录, 抑制线粒体蛋白合成, 改变膜电位, 影响氧化还原功能, 减少细胞ATP的储备等^[16-17]。但氧化应激引起线粒体功能障碍, 进而引起内皮细胞功能障碍的具体过程目前仍有许多未清楚。基于CyPD是线粒体通透性转换孔的一个组成部分, 当CypD蛋白与腺核苷酸移位酶之间的相互作用受到干扰或CypD蛋白、腺核苷酸移位酶异位表达时, 细胞能表现出对死亡明显的抵抗性^[18]。减少能诱导线粒体通透性转换孔开放的因素可以使心肌在再灌注损伤时获得明显的保护^[19]。例如CypD蛋白的抑制剂环孢素A及其衍生物, 通过与CypD蛋白形成复合物而减少线粒体内游离的CypD蛋白表达量, 从而阻止CypD蛋白与腺核苷酸移位酶结合, 导致线粒体通透性转换孔关闭, 能显著减少心肌缺血再灌注损伤过程中心肌梗死的面积^[20-21]。有作者利用基因敲除技术建立了CypD蛋白缺陷型大鼠, 发现该型大鼠的心脏在心肌梗死后缺血再灌注时, 心肌梗死面积较同等条件下原生型大鼠的心肌梗死面积缩小了近40%, 同时CypD蛋白缺陷型线粒体也较正常线粒体能更好的抵御钙离子诱导的细胞色素C的释放^[9, 22]。

作者假设CyPD是内皮细胞氧化损伤时的一个关键蛋白。在最初的实验中, 作者观察到, 正常ECV304细胞中有表达CyPD蛋白, 随着氧化应激的增强, ECV304细胞的凋亡增多, 其线粒体中的CyPD表达量也随之增大, 说明CyPD蛋白的合成是随着氧化应激时间的延长而增大的; 通过时实定量PCR分析, CyPD的编码基因ppif的相对表达量也随之增大。这些结果表明, 线粒体CyPD蛋白、内皮细胞凋亡、氧化应激之间确实存在一定的关联, CyPD可能在氧化应激与内皮细胞凋亡之间起了一个桥梁的作用。而以前的研究提示活性氧引起的线粒体损害是减少线粒体蛋白的合成的^[17], 这与作者的结果有些矛盾。

为了进一步验证CyPD是氧化应激诱导增多的细胞保护因子还是氧化应激触发的凋亡启动因子, 作者用siRNA沉默了ppif基因的表达, 通过H₂O₂引起氧化损伤触发细胞凋亡, 与正常的ECV304细胞比较。结果显示,

ppif沉默后的ECV304细胞对氧化损伤的抵抗性明显增强, 氧化应激诱导的细胞凋亡率明显比正常的ECV304细胞在氧化损伤时发生的凋亡率要低。透射电镜观察siRNA转染与未转染组细胞在氧化应激时超微结构的变化, 结果显示ppif缺陷型ECV304细胞在氧化应激时, 细胞凋亡的数量要比正常的ECV304细胞明显少, 而且凋亡形态改变也较正常ECV304细胞轻, 多为很早期的凋亡特征。综合上述结果, 本实验提示, CyPD是活性氧诱导增多的引起线粒体损害^[23]、进而引起内皮细胞损害的一个关键的损伤性蛋白。CyPD一个重要的作用是与腺核苷酸移位酶的结合导致线粒体通透性转换孔的开放, 进而导致膜电势($\Delta\Psi$)的下降^[24], 作者推测氧化损伤引起内皮细胞凋亡时, CyPD可能是一个细胞死亡的启动蛋白。Halestrap等^[25]提出, 偶尔、暂时的线粒体通透性转换孔开放能导致细胞凋亡, 通过使线粒体外膜肿胀、破裂, 进而释放细胞色素C, 使凋亡蛋白酶瀑式反应激活, 从而产生凋亡, 随后的线粒体通透性转换孔关闭能维持ATP的水平。过量的CyPD聚集导致线粒体通透性转换孔的持续开放, 从而启动后续一系列的凋亡级联反应, 引起大量细胞凋亡^[26]。进一步明确氧化应激引起CyPD增加的信号转导通路及CyPD在凋亡级联反应中的位置, 将有助于加深对血管功能障碍、动脉粥样硬化、血管狭窄等疾病的认识, 从而更好地防治这些疾病。

对于模拟细胞氧化应激损伤有多种方法, 包括应用同型半胱氨酸、血红素、 H_2O_2 、缺氧复氧等, 其中应用最广泛的就是 H_2O_2 氧化损伤模型^[27]。既往研究中大多是在活性氧作用于细胞后立即检验相关的指标^[28]。而体内的氧化损伤反应是一个触发后的连续过程, 即使触发因素已消除, 后续的瀑式反应仍会继续, 凋亡蛋白的合成、凋亡程序的启动均需要一个反应时间, 细胞自身也有其对抗性的调节机制, Akishita等^[29]应用 H_2O_2 , 在剂量、时间依从上处理牛颈动脉内皮细胞, 发现处理后再培养24 h内皮细胞有显著的DNA片段化和凋亡蛋白酶3活化。作者以Lee等^[10]的方法为参考, 应用500 $\mu\text{mol/L}$ 的 H_2O_2 , 按时间依从处理人脐静脉内皮细胞株ECV304后, 再更换普通培养基继续培养24 h, 成功模拟了ECV304细胞的氧化应激损伤, 电镜结果显示, 空白对照组很少有凋亡, 多为正常细胞, 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理组明显以凋亡细胞为主。凋亡率与 H_2O_2 作用时间的相关分析结果表明, 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 处理细胞所引起的细胞凋亡率与处理时间呈显著相关, 这为进一步分析细胞内成分在相应条件下诱导细胞凋亡时的变化提供了可能。对照组的相关系数太低, 且组内各时间点间凋亡率并没有差异, 其总体凋亡率与PBS作用时间有显著相关性, 可能为样本量较小导致偏倚所致。有研究表明小剂量的

H_2O_2 ($< 300 \mu\text{mol/L}$)即可以导致细胞凋亡, 过高细胞则以坏死为主^[30]。因为作者研究的是氧化损伤后的蛋白变化, 在氧化应激去除后, 再继续用含有血清的培养基培养, 这可免除血清饥饿导致的另一些应激的变化, 但所需要的 H_2O_2 的浓度也就相应要增加^[10, 31]。本实验结果也表明, 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 能很好地建立ECV304细胞凋亡模型。

致谢: 感谢中山大学统计学教研室以及中山大学第二附属医院医学研究中心的老师, 有他们的帮助该课题才得以顺利完成。

4 参考文献

- [1] Woodman CR, Price EM, Laughlin MH. Selected Contribution: Aging impairs nitric oxide and prostacyclin mediation of endothelium-dependent dilation in soleus feed arteries. *J Appl Physiol*. 2003;95:2164-2170.
- [2] Shah SV, Alam MG. Role of iron in atherosclerosis. *Am J Kidney Dis*. 2003;41:S80-83.
- [3] Handy DE, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis: diagnosis and treatment. *Curr Atheroscler Rep*. 2003;5:276-283.
- [4] Lynn EG, Austin RC. Hydrogen sulfide in the pathogenesis of atherosclerosis and its therapeutic potential. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2011;4:97-108.
- [5] Loscalzo J. Oxidant stress: a key determinant of atherothrombosis. *Biochem Soc Trans*. 2003;31:1059-1061.
- [6] Pasciu V, Posadino AM, Cossu A, et al. Akt downregulation by flavin oxidase-induced ROS generation mediates dose-dependent endothelial cell damage elicited by natural antioxidants. *Toxicol Sci*. 2009;114:101-112.
- [7] Yilmaz B, Sandal S, Carpenter DO. PCB 9 exposure induces endothelial cell death while increasing intracellular calcium and ROS levels. *Environ Toxicol* 2011.
- [8] Giorgio V, Soriano ME, Basso E, et al. Cyclophilin D in mitochondrial pathophysiology. *Biochim Bio Phys Acta*. 2009;1797:1113-1118.
- [9] Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*. 2005;434:658-662.
- [10] Lee YJ, Kang IJ, Bunger R, et al. Enhanced survival effect of pyruvate correlates MAPK and NF-kappaB activation in hydrogen peroxide-treated human endothelial cells. *J Appl Physiol*. 2004;96:793-801.
- [11] Elbashir SM, Harborth J, Weber K, et al. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*. 2002;26:199-213.
- [12] Doughan AK, Harrison DG, Dikalov SI. Molecular mechanisms of angiotensin II-mediated mitochondrial dysfunction: linking mitochondrial oxidative damage and vascular endothelial dysfunction. *Circ Res*. 2008;102:488-496.
- [13] McKenzie M, Liolitsa D, Akinshina N, et al. Mitochondrial ND5 gene variation associated with encephalomyopathy and mitochondrial ATP consumption. *J Biol Chem*. 2007;282:36845-36852.
- [14] Devarajan A, Bourquard N, Hama S, et al. Paraoxonase 2 deficiency alters mitochondrial function and exacerbates the development of atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal*. 2010;14:341-351.
- [15] Ballinger SW, Patterson C, Knight-Lozano CA, et al. Mitochondrial integrity and function in atherosclerosis. *Circulation*. 2002;106:544-549.
- [16] Ballinger SW, Patterson C, Yan CN, et al. Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res*. 2000;86:960-966.
- [17] Thum T, Borlak J. LOX-1 receptor blockade abrogates oxLDL-induced oxidative DNA damage and prevents activation of the transcriptional repressor Oct-1 in human coronary arterial endothelium. *J Biol Chem*. 2008;283:19456-19464.
- [18] Ramachandran A, Lebofsky M, Baines CP, et al. Cyclophilin D deficiency protects against acetaminophen-induced oxidant stress and liver injury. *Free Radic Res*. 2010;45:156-164.
- [19] Elrod JW, Wong R, Mishra S, et al. Cyclophilin D controls mitochondrial pore-dependent Ca^{2+} exchange, metabolic flexibility, and propensity for heart failure in mice. *J Clin Invest*. 2010;120:3680-3687.
- [20] Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, et al. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;38:367-374.

- [21] Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res.* 2004;61:372-385.
- [22] Hu W, Chen Z, Ye Z, et al. Knockdown of Cyclophilin D Gene by RNAi Protects Rat from Ischemia/ Reperfusion-Induced Renal Injury. *Kidney Blood Press Res.* 2010;33:193-199.
- [23] King AL, Swain TM, Dickinson DA, et al. Chronic ethanol consumption enhances sensitivity to Ca(2+)-mediated opening of the mitochondrial permeability transition pore and increases cyclophilin D in liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010; 299:G954-966.
- [24] Shulga N, Wilson-Smith R, Pastorino JG. Sirtuin-3 deacetylation of cyclophilin D induces dissociation of hexokinase II from the mitochondria. *J Cell Sci.* 2010;123:894-902.
- [25] Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, et al. Mitochondria and cell death. *Bio Chem Soc Trans.* 2000;28:170-177.
- [26] Brust D, Daum B, Breunig C, et al. Cyclophilin D links programmed cell death and organismal aging in *Podospiraanserin*. *Aging Cell.* 2010;9:761-775.
- [27] Diestel A, Drescher C, Miera O, et al. Hypothermia protects H9c2 cardiomyocytes from H₂O₂ induced apoptosis. *Cryobiology.* 2010; 62:53-61.
- [28] Farombi EO, Moller P, Dragsted LO. Ex-vivo and in vitro protective effects of kolaviron against oxygen-derived radical-induced DNA damage and oxidative stress in human lymphocytes and rat liver cells. *Cell Biol Toxicol.* 2004;20:71-82.
- [29] Akishita M, Nagai K, Xi H, et al. Renin-angiotensin system modulates oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis in rats. *Hypertension.* 2005;45:1188-1193.
- [30] Zheng YS, Li Y, Zhang SH. *Disi Junyi Daxue Xuebao.* 2001; 22(20):1849-1851.
郑延松, 李源, 张珊红. 用低浓度过氧化氢建立心肌细胞氧化损伤模型[J]. *第四军医大学学报.* 2001,22(20):1849-1851.
- [31] Lee YA, Cho EJ, Yokozawa T. Protective effect of persimmon (*Diospyros kaki*) peel proanthocyanidin against oxidative damage under H₂O₂-induced cellular senescence. *Biol Pharm Bull.* 2008; 31:1265-1269.

来自本文课题的更多信息一

作者贡献: 课题在杨艳旗教授、陈炬教授的指导下完成, 两位教授在课题的设计、实施及数据统计分析提供了全面的指导; 全部实验过程由第一作者彭江洲完成, 陈柏深博士协助完成实验中的分子生物学部分, 薛雷硕士协助完成细胞培养及 DNA 提取。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 无涉及伦理冲突的内容。

文章概要:

文章要点: 假设 CypD 蛋白是活性氧诱导增多的, 引起线粒体损害、进而引起内皮细胞凋亡的一个关键的损伤性蛋白。

关键信息: 位于线粒体基质中的 CypD 蛋白是线粒体通透性转换孔的组成部分; 在各种危险因素引起的动脉粥样硬化的发生过程中, 线粒体的损害是一种较为普遍的机制。

研究的创新之处与不足: 实验成功合成了 ppif 基因的 siRNA, 特异、高效地沉默了内皮细胞线粒体 ppif 基因的表达; 证实氧化应激条件下, CypD 蛋白是活性氧诱导增多的, 引起线粒体损害、进而引起内皮细胞凋亡的一个关键的损伤性蛋白。课题拟继续完成活性氧诱导 CypD 蛋白增多的信号通道分子机制研究。

本期专题: 药物及细胞因子对血管内皮细胞的干预作用②

4 碱性成纤维细胞生长因子荧光真核表达载体构建及对过氧化氢诱导血管内皮细胞凋亡的影响

徐彬(广东药学院生命科学与生物制药学院, 广东省广州市 510006)

推荐理由: 在组织修复的过程中, 新生血管形成起着关键性作用。碱性成纤维细胞生长因子可诱导血管内膜的各类细胞表达组织重建所需要的蛋白水解酶和胶原酶等, 诱导血管内皮细胞长入胶原基质中形成管腔, 促进新生血管形成。研究表明碱性成纤维细胞生长因子有促进多种细胞存活和抑制凋亡的作用。实验构建表达碱性成纤维细胞生长因子的荧光真核表达载体导入体外培养的人脐静脉内皮细胞, 证实碱性成纤维细胞生长因子基因转染能抑制过氧化氢诱导的血管内皮细胞凋亡, 其作用机制可能与调控Bax蛋白表达和caspase-3活性有关。见15卷2011年24期4427-4431页。

5 脑微血管内皮细胞缺氧模型转化生长因子β1表达与脑溢安的干预

万赛英(广州中医药大学附属佛山中医院, 广东省佛山市 528000)

推荐理由: 脑微血管内皮细胞主要参与构成血脑屏障保护脑组织, 脑出血后脑微血管内皮细胞受损, 血管舒缩活性物质释放发生紊乱, 导致血管痉挛, 从而加重脑出血所致的缺氧损伤。脑出血急性期患者服用脑溢安能促进血肿吸收及神经功能恢复, 提高生活质量。动物实验也证明脑溢安能促进实验性脑出血大鼠血肿吸收、减轻脑水肿及缺血神经细胞的损害。本实验用原代分离培养新生大鼠的脑微血管内皮

细胞, 采用中药血清药理学的方法, 证实脑溢安血清下调转化生长因子β1mRNA的表达可能是其抑制脑微血管内皮细胞的凋亡对缺氧损伤脑微血管内皮细胞的保护作用机制之一。见15卷2011年46期8625-8629页。

6 醒脑静抑制重组人肿瘤坏死因子介导的人脐静脉内皮细胞增殖

欧阳海春(佛山市顺德区第一人民医院心血管内科, 广东省佛山市 528300)

推荐理由: 冠状动脉粥样硬化性心脏病的病理基础是动脉粥样硬化, 动脉粥样硬化是对血管损伤的过度炎症反应, 动脉粥样过程中释放大量的炎症介导体。肿瘤坏死因子α是炎症反应的关键调节因子之一, 在动脉粥样硬化发生发展中起着关键的作用, 内皮细胞表面有肿瘤坏死因子α受体, 为肿瘤坏死因子α主要靶细胞之一。肿瘤坏死因子α影响动脉粥样硬化的发生、发展的机制很多, 其中增加内皮细胞增殖活性是其中最重要的途径之一。醒脑静注射液具有清热解毒、凉血活血、开窍醒脑之功能, 临床上已广泛用于缺血性脑梗死。实验旨在从调节内皮细胞增殖活力的角度进一步探讨醒脑静注射液治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病的药理作用机制, 结果证实醒脑静能有效抑制重组人肿瘤坏死因子α介导的人脐静脉内皮细胞增殖。见16卷2012年2期239-242页。

7 辛伐他汀抑制高糖诱导人脐静脉内皮细胞的凋亡

徐茂凤(长春医学高等专科学校护理系内外护理教研室, 吉林省长春市 130031)

推荐理由: 目前相关医学研究表明高血糖对动脉粥样硬化的发生有促进作用。而血管内皮细胞结构与功能的异常, 尤其是血管内皮细胞的凋亡在动脉粥样硬化的发生中起重要的作用。有学者认为血管内皮细胞凋亡增加将导致血管调节功能失衡, 促进血管平滑肌细胞增殖、迁移, 从而被认为是动脉粥样硬化发生的始动因素。他汀类药物是目前临床上治疗高胆固醇血症最有效的一类药物, 但大量的研究表明他汀类药物的许多药理作用与其降胆固醇效应无关。本次实验证实高糖可通过促进促凋亡蛋白P53的表达进而促进人脐静脉内皮细胞的凋亡, 而辛伐他汀可抑制此作用。见15卷2011年41期7726-7729页。

8 香烟提取物损伤人脐静脉血管内皮细胞及阿托伐他汀的干预

黄旭(重庆医科大学附属第一医院血管外科, 重庆市 400016)

推荐理由: 吸烟是诸多血管缺血性疾病如动脉硬化闭塞、血栓闭塞性脉管炎等疾病的重要因素, 而此类疾病的始动因素则往往是血管内皮细胞的损伤, 因此, 探究吸烟对血管内皮细胞的损伤有利于了解此类疾病发生机制。本文采用体外细胞培养的方法来探究香烟提取物对血管内皮细胞的损伤, 并同时探究阿托伐他汀对该损伤的干预作用, 结果发现阿托伐他汀能拮抗香烟提取物对血管内皮细胞的损伤作用, 其机制可能与内皮细胞的生长、一氧化氮合成酶活性及一氧化氮释放有关。见15卷2011年50期9339-9343页。

详见: [www.crter.org/Html/ 2012_04_10/2_64024_2012_04_10_200196.html](http://www.crter.org/Html/2012_04_10/2_64024_2012_04_10_200196.html)