

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.37.022 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]
何战斌, 陈广伟. 肿瘤坏死因子 α 促进人冠状动脉内皮细胞的凋亡[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(37): 6947-6950.

肿瘤坏死因子 α 促进人冠状动脉内皮细胞的凋亡

何战斌¹, 陈广伟²

文章亮点: 观察肿瘤坏死因子 α 对人冠状动脉内皮细胞的损伤作用, 并探讨其凋亡作用, 结果发现肿瘤坏死因子 α 具有抑制人冠状动脉内皮细胞增殖作用, 抑制作用呈浓度和时间依赖性。

关键词: 人冠状动脉内皮细胞; 凋亡; 线粒体膜电位; 肿瘤坏死因子 α ; 增殖

摘要

背景: 研究表明冠状动脉内皮细胞凋亡参与了动脉粥样硬化的发生、发展过程。

目的: 观察肿瘤坏死因子 α 对人冠状动脉内皮细胞的诱导损伤作用。

方法: 取对数生长长期的人冠状动脉内皮细胞 c-12221, 分别加入含 0(对照), 200, 400, 600 mg/L 肿瘤坏死因子 α 的培养液, 采用 MTT 检测细胞增殖率变化, Hoechst 33258/PI 双染观察凋亡细胞形态变化, Annexin V-FITC 和 PI 双染流式检测细胞凋亡率变化, 高内涵活细胞成像系统检测细胞线粒体膜电位变化。

结果与结论: 肿瘤坏死因子 α 呈剂量依赖性抑制人冠状动脉内皮细胞的增殖。Hoechst 33258/PI 染色观察可见凋亡细胞染色质凝集、细胞核碎裂成碎片等典型细胞凋亡的特征性变化, 不同质量浓度肿瘤坏死因子 α 组细胞凋亡率高于对照组($P < 0.05$), 线粒体膜电位低于对照组($P < 0.05$), 且呈剂量依赖性。表明肿瘤坏死因子 α 呈剂量依赖性促进人冠状动脉内皮细胞凋亡, 抑制其增殖, 作用机制与线粒体凋亡通路有关。

Tumor necrosis factor alpha promotes the apoptosis of human coronary artery endothelial cells

He Zhan-bin¹, Chen Guang-wei²

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that the apoptosis of human coronary artery endothelial cells is involved in the generation and development of atherosclerosis.

OBJECTIVE: To investigate the inductive effect of tumor necrosis factor alpha on the damage of human coronary artery endothelial cells.

METHODS: First, human coronary artery endothelial cells c-12221 in the logarithmic growth phase were selected. Next, the cells were added into 0 (control), 200, 400 and 600 mg/L tumor necrosis factor alpha culture medium. Then, the changes of cell proliferation rate, morphological changes of apoptosis cells, changes of cell apoptosis rate and mitochondrial membrane potential were detected by MTT assay, Hoechst 33258/propidium iodide staining, fluorescence microscopy, Annexin V-FITC and PI-double staining flow cytometry assay and high content live cell imaging system, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: MTT results showed that tumor necrosis factor alpha had potential inhibitory effects on human coronary artery endothelial cells proliferation in a dose-dependent manner. Hoechst 33258/propidium iodide staining indicated that characteristic change of apoptotic cells could be seen clearly, such as chromatin condensation, nuclear fragmentation into pieces. Besides, cell apoptosis rate of tumor necrosis factor alpha with different concentrations was higher than that of 0 mg/L tumor necrosis factor alpha ($P < 0.05$); their mitochondrial membrane potential was lower than that of the control and in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). These results suggest that tumor necrosis factor alpha can promote the apoptosis of human coronary artery endothelial cells in a dose- and time-dependent manner and inhibit human coronary artery endothelial cell proliferation. The underlying mechanisms are related to mitochondrial apoptosis pathway.

He ZB, Chen GW. Tumor necrosis factor alpha promotes the apoptosis of human coronary artery endothelial cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(37): 6947-6950.

¹ 开封市第一人民医院心内二科, 河南省开封市 475004; ² 河南大学医学院, 河南省开封市 475004

何战斌, 男, 1973年生, 河南省开封市人, 主治医师, 主要从事心血管内科临床工作。

通讯作者: 陈广伟, 硕士, 河南大学医学院, 河南省开封市 475004
guangweichen2009@163.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2012)37-06947-04

收稿日期: 2012-01-06
修回日期: 2012-02-29
(20111212004/GW·T)

¹Second Department of Cardiology, the First People's Hospital of Kaifeng, Kaifeng 475004, Henan Province, China; ² Medical College of Henan University, Kaifeng 475004, Henan Province, China

He Zhan-bin, Attending physician, Second Department of Cardiology, the First People's Hospital of Kaifeng, Kaifeng 475004, Henan Province, China

Corresponding author: Chen Guang-wei, Master, Medical College of Henan University, Kaifeng 475004, Henan Province, China
guangweichen2009@163.com

Received: 2012-01-06
Accepted: 2012-02-29

0 引言

人冠状动脉内皮细胞为覆衬于心、血管内表面的单层扁平细胞, 是容易受损伤的敏感细胞之一, 如缺氧、休克、感染等损伤因素可引起人冠状动脉内皮细胞活性改变, 释放多种物质, 产生一系列损伤的病理生理过程, 最终导致其死亡^[1-2]。近年来, 随着分子心血管病学的深入研究, 越来越多的资料表明人冠状动脉内皮细胞凋亡参与了动脉粥样硬化的发生、发展过程^[3], 被认为是动脉粥样硬化的始动步骤。本实验通过肿瘤坏死因子 α 对人冠状动脉内皮细胞的损伤作用, 观察凋亡细胞变化等途径来探讨凋亡通路。

1 材料和方法

设计: 对比分组细胞学观察实验。

时间及地点: 于2010-10/2011-05在开封市第一人民医院心内二科与河南大学医学院完成。

材料:

试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
人冠状动脉内皮细胞株 c-12221	Science Cell 公司
Hoechst 33258	Solarbi 公司
肿瘤坏死因子 α (Human, CAT #CYT-223)	PROSPEC 公司
流式细胞仪	BD 公司, USA

方法:

实验分组: 取对数生长期 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 人冠状动脉内皮细胞株c-12221接种至96孔细胞培养板, 0.2 mL/孔, 边缘孔不加, 除去边缘效应; 培养24 h后, 弃培养液, 分别加入含200, 400, 600 mg/L不同质量浓度肿瘤坏死因子 α 的DMEM培养液处理细胞(每个质量浓度3个复孔), 肿瘤坏死因子 α 初始质量浓度为1 000 mg/L, 依次倍比稀释至终质量浓度为100 mg/L, 对照组只加培养液。

MTT检测细胞增殖的变化: 培养24, 48, 72 h, 每孔加入5 g/L MTT 20 μL 培养4 h后, 吸去培养

液, 每孔加入150 μL DMSO振荡器振荡5 min, 蓝色晶体完全溶解后, 酶标仪检测 A_{570} 值; 以等体积DMSO和培养液的无细胞孔测得的吸光度值为空白对照。

按下列公式计算抑制率:

$$\text{抑制率}\% = \left(1 - \frac{\text{实验组 } A \text{ 值} - \text{空白对照组 } A \text{ 值}}{\text{正常组 } A \text{ 值} - \text{空白对照组 } A \text{ 值}}\right) \times 100\%$$

Hoechst 33258/PI染色观察凋亡细胞形态: 对数生长期细胞按 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 浓度接种6孔板内多聚赖氨酸处理的盖玻片上, 不同质量浓度肿瘤坏死因子 α 处理24 h后, 去培养液, 加入冰浴PBS洗涤细胞3次, 5 min/次; Hoechst 33258染液5 mg/L, 每孔加400 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光染色15 min; 继续加15 mg/L的PI染液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光15 min, 去染液, 加40 g/L多聚甲醛400 μL 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定10 min, 荧光显微镜下拍摄。

流式细胞术测定细胞凋亡: 不同质量浓度肿瘤坏死因子 α 处理人冠状动脉内皮细胞株c-12221 24 h后, 用Annexin V-FITC和PI双染法测定, 先用0.25%胰酶处理吹打后收集细胞至EP管中; 调整细胞浓度为 $1 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 1 500 r/min离心10 min; PBS洗涤2次, 1 500 r/min离心5 min; 用500 μL 不含双抗培养液重悬细胞, 每样本加入10 μL media binding reagent, 再加1.25 μL Annexin V-FITC, 室温避光孵育15 min; 1 500 r/min离心10 min; 弃除上清液, 加500 μL 冰浴的1 \times Buffer重悬细胞, 加10 μL PI, 避光至冰上, 用流式细胞仪检测。每样本检测 1×10^4 细胞, 用Cellquest进行凋亡分析。

肿瘤坏死因子 α 干预后细胞线粒体膜电位变化: 取对数生长期细胞浓度为 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 接种于用多聚赖氨酸处理的盖玻片上; 用不同质量浓度肿瘤坏死因子 α 处理24 h后, 弃除培养液, 加冰浴PBS洗涤细胞3次, 分别加入1.5 mL细胞培养液与1.5 mL JC-1染色液, 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min, 1 200 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min沉淀细胞; 用冰浴的JC-1染色缓冲液(1 \times)洗涤2次, 加5 mg/L Hoechst 33258避光染色15 min, PBS洗涤3次, 高内涵细胞成像观察。

主要观察指标: 经不同质量浓度肿瘤坏死因子 α 处理后人冠状动脉内皮细胞的增殖与凋亡变化。

统计学分析: 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 14.0 软件包处理。所用统计分析方法为成组 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 MTT法测定各组细胞增殖率变化 MTT检测显示, 对照组 A_{570} 值降低, 不同质量浓度肿瘤坏死因子 α 处理后, 各样本 A_{570} 值增高, 在质量浓度为 200 mg/L 处理 24 h 时 IC_{50} 值达 4.61 $\mu\text{mol/L}$, 与质量浓度正相关, 见表 1。

表 1 肿瘤坏死因子 α 对人冠状动脉内皮细胞增殖的影响
Table 1 Effect of tumor necrosis factor α (TNF- α) on the proliferation of human coronary artery endothelial cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	A_{570}
Control	0.10 \pm 0.03
200 mg/L TNF- α	0.14 \pm 0.05
400 mg/L TNF- α	0.27 \pm 0.04 ^a
600 mg/L TNF- α	0.39 \pm 0.35 ^a

^a $P < 0.01$, vs. control group; A: absorbance

2.2 Hoechst 33258/PI染色观察各组细胞凋亡 不同质量浓度肿瘤坏死因子 α 作用人冠状动脉内皮细胞 24 h 后, Hoechst 33258/PI 染色观察凋亡细胞形态, 正常细胞为蓝色, 经肿瘤坏死因子 α 处理凋亡细胞可见染色质凝聚、致密, 细胞核碎裂呈片状弥漫分布, 见图 1。

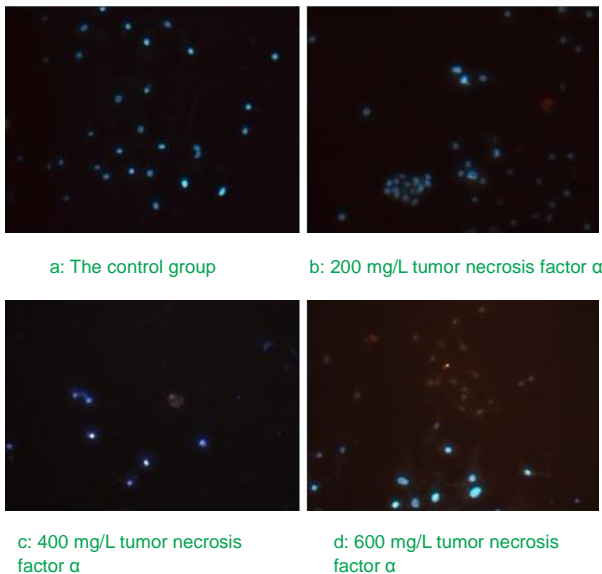


Figure 1 Morphological changes of human coronary artery endothelial cells (Hoechst 33258/propidium iodide staining, $\times 10$)
图 1 Hoechst 33258/PI 染色观察人冠状动脉内皮细胞形态改变 ($\times 10$)

2.3 流式术观察各组细胞凋亡变化 Annexin V-FITC 和 PI 双染法流式细胞术检测不同质量浓度肿瘤坏死因子 α 处理对人冠状动脉内皮细胞凋亡结果见图 2。

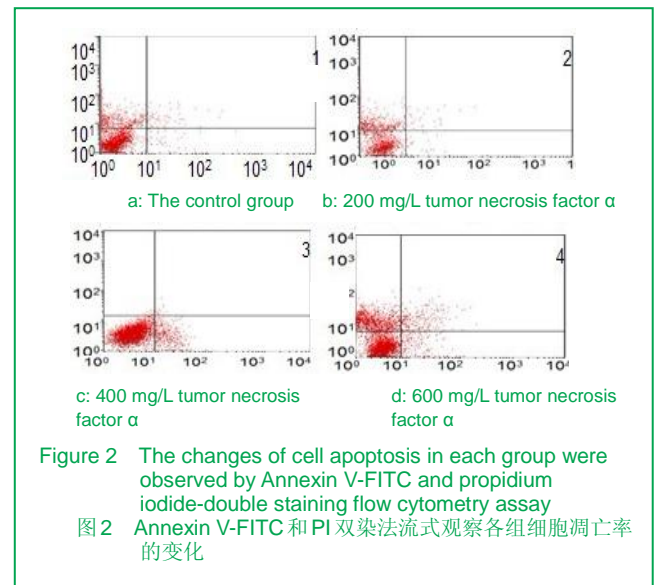


Figure 2 The changes of cell apoptosis in each group were observed by Annexin V-FITC and propidium iodide-double staining flow cytometry assay
图 2 Annexin V-FITC 和 PI 双染法流式观察各组细胞凋亡率的变化

对照组自然凋亡率为 1.69%; 200, 400, 600 mg/L 肿瘤坏死因子 α 处理 24 h 后细胞凋亡率分别为 27.17%, 30.54%, 33.25%, 与对照组比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 不同质量浓度组间相比较细胞凋亡率变化不显著。

2.4 各组细胞线粒体膜电位的变化 见图 3。

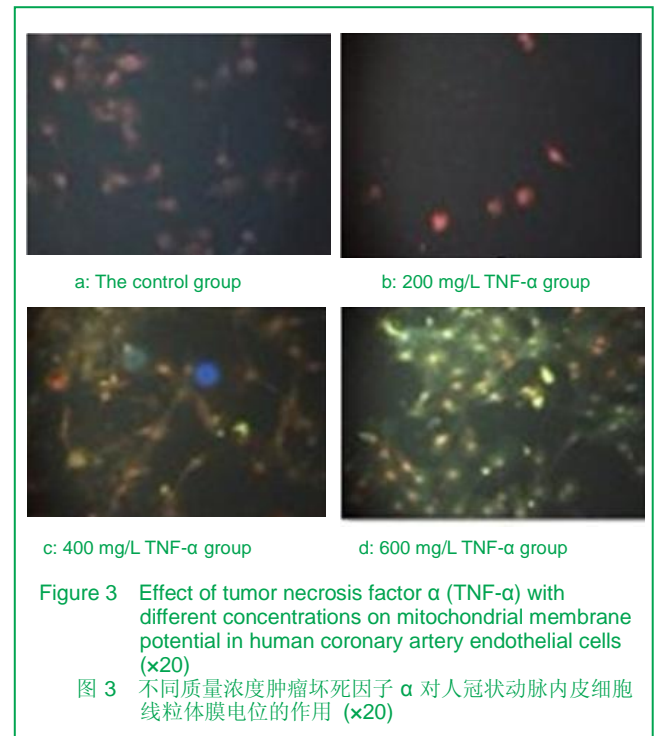


Figure 3 Effect of tumor necrosis factor α (TNF- α) with different concentrations on mitochondrial membrane potential in human coronary artery endothelial cells ($\times 20$)
图 3 不同质量浓度肿瘤坏死因子 α 对人冠状动脉内皮细胞线粒体膜电位的作用 ($\times 20$)

不同质量浓度肿瘤坏死因子 α 作用人冠状动脉内皮细胞 24 h 后, 高内涵活细胞成像系统检测 6 孔板中每孔绿色荧光强度及红色荧光强度, 发现其比值随药物质量

浓度增加而增大,表明细胞线粒体膜电位降低,与对照组相比较分别降低(7.12±5.91)%, (26.32±4.18)%, (39.51±3.74)%。不同质量浓度肿瘤坏死因子 α 处理人冠状动脉内皮细胞线粒体膜电位降低与对照组比较差异有显著性意义($P < 0.05$)。

3 讨论

实验通过用MTT检测肿瘤坏死因子 α 对人冠状动脉内皮细胞增殖的抑制作用,结果显示不同质量浓度具有不同程度的抑制作用; Hoechst33258/PI观察细胞形态改变,表现为染色质凝集,核碎裂成片状;流式术及线粒体膜电位结果显示人冠状动脉内皮细胞呈现不同程度的凋亡状态,提示肿瘤坏死因子 α 通过诱导细胞凋亡抑制人冠状动脉内皮细胞增殖作用的。线粒体在损伤作用刺激下,线粒体的膜电位丢失,通透性发生改变,凋亡因子从线粒体释放到细胞质,并造成DNA损伤,能激活线粒体凋亡途径和膜死亡受体途径造成细胞凋亡,线粒体途径受Bcl-2家族控制^[4-5],线粒体产生ATP功能的丧失^[6],细胞色素C发生构像变化激活Caspase-9前体,Caspase-9前体被反式催化激活,继而作用于下游的Caspase-9和Caspase-3激活途径,诱导细胞凋亡^[7-9]。

人冠状动脉内皮细胞内覆于血管壁,受到多种因素的刺激,包括凋亡诱导因素和抑制因素两大类。当凋亡诱导因素增多,凋亡抑制因素不足以对抗时,凋亡程序被激活,人冠状动脉内皮细胞就会发生凋亡,且凋亡诱导因子持续高水平表达时,人冠状动脉内皮细胞表现为过度凋亡^[10]。

动脉粥样硬化的慢性炎症理论已被广泛认可,新的研究发现细胞凋亡及免疫调节与其关系密切^[12]。在这一过程中,免疫调节在抗原递呈中有重要意义^[13],细胞凋亡促进了二者的进展。血管内皮细胞的完整和功能对维持血管壁屏障作用以及调节代谢物和传递信息至关重要^[14],并具有分泌抗动脉粥样硬化和致动脉粥样硬化物质的作用^[14],Luscher等^[15]也认为内皮细胞参与了动脉粥样硬化的发生发展。

致谢:向刘彬院长、张伟娟教授给予的指导和帮助表示衷心感谢!

4 参考文献

[1] Yang B, Yang S, Zhou JZ. Zhongguo Bingli Shengli Zazhi. 2010;26(3): 452-456.
杨冰,杨松,周建中.阿托伐他汀钙对高血压大鼠人冠状动脉细胞的保护作用[J].中国病理生理杂志,2010,26(3):452-456.

[2] Zhang JY,Zhang L,Li J,et al.Zhonghua Gaoxueya Zazhi. 2009; 16(4):307-310.
张金盈,张力,厉菁,等.阿托伐他汀增加高血压患者外周血内皮祖细胞数量[J].中华高血压杂志,2009,16(4):307-310.

[3] Noonan DM,Vannini N,Pfeffer U,et al.Endothelial cell aging and apoptosis in prevention and disease: E selectin expression and modulation as a model.Curr Pharm Des. 2008;14(3): 221-225.

[4] Xie CY,Zhu H,Lin LP,et al.MFTZ-1,an actinomycetes subspecies derived antitumor macrolide, functions as a novel topoisomerase II poison.Mol Cancer Ther.2007;6(11):3059-3070.

[5] Xie SQ,Li Q,Zhang YH,et al.Zhongguo Yaoli xue Tongbao. 2010;26(2):169-177.
谢松强,李骞,张亚宏,等.萘酰亚胺-多胺缀合物NNINspm通过PI3 K/Akt信号通路诱导肝癌细胞凋亡[J].中国药理学通报, 2010,26(2):169-177.

[6] Du C,Fang M,Li Y,et al.Smac,a mitochondrial protein that promotes cytochrome c - dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition.Cell.2000;102 (1):33-42.

[7] Pandey P, Saleh A,Nakazawa A,et al.Negative regulation of cytochrome C2medi-ated oligomerization of Apaf21 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90.EMBO J.2000;19(16) :4310-4322.

[8] FanJun,Zhang XY,Zhang ZJ,et al.Zhongguo Yaolixue yu Dulixue Zazhi.2007;21(2):131-134.
范俊,张小燕,张志杰,等.麦冬不同提取部位对过氧化氢所致血管内皮细胞损伤的保护作用[J].中国药理学与毒理学杂志, 2007, 21(2):131-134.

[9] Li Q,Wu ZQ,Ma XT,et al.Zhonghua Zhongyiyao Zazhi.2010; 25(7):1137-1139.
李响,吴振起,马雪涛,等.注射用血栓通对大鼠人冠状动脉细胞凋亡机制的影响[J].中华中医药杂志,2010,25(7):1137-1139.

[10] Wang XT.Shiyong Yixue Zazhi. 2011;27(16):3072-3073.
王雪婷.人冠状动脉细胞凋亡与动脉粥样硬化[J].实用医学杂志, 2011,27(16): 3072-3073.

[11] Wang SY,Zhang ZB.Liaoning Zhongyiyao Daxue Xuebao. 2011; 13(3):50-51.
王书乐,张志斌.人冠状动脉细胞凋亡研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2011,13(3):50-51.

[12] Hansson GK,Libby P,Schonbeck U,et al.Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis.Circ Res. 2002;91:281-291.

[13] Watanabe M,Takagi Y,Kotani M,et al.Down-Regulation of ICOS Ligand by Interaction with ICOS Functionsasa Regulatory Mechanism for Immune Responses. J Immunol. 2008;180:5222-5252.

[14] Abello PA,Fidler SA,Bulkley GB,et al.Antioxidants modulate induction of programmed endothelial cell death(apoptosis) by endotoxin.Arch Surg.1994;129(2):134-141.

[15] Luscher TF,Noll G. The pathogens is of cardiovascular disease:role of the endothelium as a target and mediator Atherosclerosis.1995,118(suppl):S81.

来自本文课题的更多信息--

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。