

聚肌胞对人脐血内皮祖细胞增殖和凋亡的影响及其机制

杨梅, 肖智林, 陈美芳, 陈晓彬, 谢秀梅

(中南大学湘雅医院老年病科, 湖南省长沙市 410008)

[关键词] 聚肌胞; 内皮祖细胞; 细胞周期; 细胞凋亡

[摘要] 目的 观察 Toll 样受体 3(TLR3)的配体聚肌胞(PolyI:C)对人脐血内皮祖细胞(EPC)增殖、凋亡的影响并阐明其具体机制。方法 采用不同浓度的聚肌胞持续干预 EPC,通过流式细胞术检测聚肌胞对 EPC 细胞周期时相分布及细胞凋亡的影响。利用 CCK-8 细胞增殖试验分别检测肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和白细胞介素 1β (IL- 1β)对细胞凋亡的影响,以及含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 Caspase 8、Caspase 9 的抑制剂、IL- 1β 受体的中和抗体对聚肌胞诱导 EPC 凋亡的作用。结果 与对照组相比,较高浓度的聚肌胞(1、10 g/L)显著减少 S 期和 G2/M 期细胞比例,并通过下调细胞周期蛋白 A、B1、D1、E 的表达阻滞细胞周期于 G0/G1 期;同时聚肌胞还呈剂量依赖性诱导 EPC 凋亡。Caspase 8 和 Caspase 9 的抑制剂并不能抑制聚肌胞诱导的细胞凋亡;TNF- α 对 EPC 的凋亡率无影响;IL- 1β 呈剂量依赖性诱导 EPC 凋亡;而使用 IL- 1β 受体的中和抗体 anti-IL-1R1 预先封闭 IL- 1β 的结合位点后,再加入聚肌胞干预,结果发现高浓度的 anti-IL-1R1 可以部分抑制聚肌胞诱导的细胞凋亡。结论 高浓度的聚肌胞通过将细胞周期阻滞于 G0/G1 期并诱导细胞凋亡从而抑制 EPC 增殖。聚肌胞活化 TLR3 后通过上调 IL- 1β 的表达诱导 EPC 凋亡,而内、外源性细胞凋亡途径及 TNF- α 均不参与聚肌胞诱导的细胞凋亡。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of PolyI : C on the Proliferation and Apoptosis of Human Umbilical Cord Blood-derived Endothelial Progenitor Cells and Its Mechanism

YANG Mei, XIAO Zhi-Lin, CHEN Mei-Fang, CHEN Xiao-Bin, and XIE Xiu-Mei

(Department of Geriatrics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China)

[KEY WORDS] PolyI : C; Endothelial Progenitor Cells; Cell Cycle; Cell Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To analyze the effect of Toll like receptor 3 (TLR3) agonist PolyI : C on the proliferation and apoptosis of human umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cells (EPC) and its mechanism. **Methods** Endothelial progenitor cells were treated with different concentrations of PolyI : C sequentially, and then the phase of cell cycle and cell apoptosis were tested by flow cytometry. CCK-8 assay was used to detect the effect of TNF- α and IL- 1β on the apoptosis of endothelial progenitor cells, and the effect of Caspase 8 inhibitor, Caspase 9 inhibitor and IL-1 receptor 1 neutralizing antibody (anti-IL-1R1) on PolyI : C-induced apoptosis. **Results** Compared with the control group, PolyI : C at high concentrations of 1 and 10 g/L significantly decreased the proportion of cells in S phase and G2/M phase. Moreover, PolyI : C down-regulated the gene expression of cyclin A, B1, D1 and E, inducing cell cycle arrest in G0/G1 phase. Additionally, PolyI : C induced the apoptosis of endothelial progenitor cells in a dose-dependent manner. Caspase 8 and Caspase 9 inhibitors did not reduce PolyI : C-induced apoptosis of endothelial progenitor cells. TNF- α had no effect on apoptosis of endothelial progenitor cells. IL- 1β induced cell apoptosis in a dose-dependent manner. Moreover, when endothelial progenitor cells pre-treated with anti-IL-1R1, then re-stimulated with PolyI : C, the cell apoptosis induced by PolyI : C was decreased. **Conclusions** PolyI : C at high concentrations inhibited endothelial progenitor cells proliferation by inducing cell cycle arrest in G0/G1 phase and inducing cell apoptosis of endothelial progenitor cells. PolyI : C induced the apoptosis of endothelial progenitor cells through up-regulating the expression of IL- 1β via activating TLR3. Endogenous and exogenous apoptosis pathway and TNF- α did not contribute to PolyI : C-induced cell apoptosis.

[收稿日期] 2016-01-25

[修回日期] 2016-05-08

[作者简介] 杨梅, 医师, 主要从事内皮细胞在心血管疾病中的基础研究与临床应用, E-mail 为 252546748@qq.com。肖智林, 主治医师, 主要从事内皮细胞在心血管疾病中的基础研究与临床应用。通讯作者谢秀梅, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管疾病的基础与临床研究, E-mail 为 xyxiem@sina.com。

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是冠心病、动脉瘤和外周动脉疾病等多种血管疾病共同的病理生理基础,诸多危险因素造成的内皮功能障碍和损伤启动的内皮细胞丢失被认为是 As 的始动环节^[1]。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPC)是一类血管内皮细胞的前体细胞,能进一步增殖并分化为成熟血管内皮细胞,其生物学功能主要是促进血管新生和参与血管损伤后的内皮修复^[2],故 EPC 的功能紊乱及损伤与 As 的发生与发展密切相关。近年来 As 也被认为是一种自身免疫性疾病, Toll 样受体(Toll like receptor, TLR)是与免疫反应相关的一种模式识别受体家族,在天然免疫和获得性免疫中发挥重要作用,已成为国内外研究的热点。本课题组在前期的研究中已经成功地从人脐静脉血中分离和培养出 EPC,并发现病毒 dsDNA 的类似物聚肌胞(PolyI:C)能上调 TLR3 在 EPC 中的表达,且通过活化 TLR3 诱导 EPC 凋亡,抑制其增殖,并呈剂量依赖性上调多种炎症因子的表达,提示病毒感染活化的 TLR3 及其介导的免疫反应可能在 As 的发生、发展中发挥了一定的作用^[3],但其作用机制尚不清楚。本研究进一步探讨聚肌胞抑制 EPC 增殖及诱导凋亡的具体作用机制,为 As 的临床干预提供新的策略。

1 材料和方法

1.1 细胞来源

EPC 来自人脐带静脉血。人脐血样本取自武汉大学人民医院产科足月健康产妇,每次取血 40 mL,肝素(200 kU/L)抗凝。所有血标本均来自健康妊娠产妇,并征得产妇本人及家属的同意。

1.2 试剂与仪器

EBM-2 培养基(Clontechs 公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),人淋巴细胞分离液 Ficoll-Histopaque-1077(Sigma 公司),聚肌胞、Cisplatin(InvivoGen 公司),Trizol、TNF- α 、IL-1 β 、抗 IL-1R1 抗体(Invitrogen 公司),RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit、2 \times PCR Master Mix(Fermentas 公司),PI-Annexin V 凋亡试剂盒(联科生物工程有限公司),碘化丙啶(Sigma 公司),RNaseA、Triton-X100(碧云天生物技术研究所),Cell Counting Kit-8(日本同仁公司),Caspase 8 抑制剂 Z-IETD-FMK、Caspase 9 抑制剂 Z-LEHD-FMK(R&D Systems, Inc)。CO₂ 培养箱(日本 ESPRC 公司),PCR 仪(美国 ABI 公司),酶联免疫检测仪(PerkinElmer 公司),流式细胞仪 FACS Calibur(美国 BD 公司),高速冷冻离心机(德国 Thermo 公司),微型电泳槽、电

泳仪(北京六一仪器厂)。

1.3 PI 单染法检测细胞周期

6 孔板培养的 EPC 先用无血清的 EBM-2 培养基培养 6 h 使细胞同步化,6 h 后换用含 10%FBS 的 EBM-2 培养基,同时加入不同浓度的聚肌胞干预(0、0.1、1 及 10 g/L)。24 h 后消化,离心收集细胞,用 70%乙醇重悬细胞并于 4 $^{\circ}$ C 固定过夜。洗涤收集细胞,加入 939 μ L PBS 和 10 g/L 的 RNaseA 10 μ L,室温孵育 30 min;再加入 1 μ L Triton-X100 和 50 μ L 1 g/L 的碘化丙啶,4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min 后进行流式细胞仪检测。

1.4 PI-Annexin V 凋亡试剂盒检测细胞凋亡

用不同浓度的聚肌胞(0、0.01、0.1、1 及 10 g/L)干预 EPC,设立 5 g/L 顺铂干预为阳性对照组。24 h 后分组消化收集细胞,调整细胞浓度为 1×10^9 /L,每管细胞中加入 5 μ L Annexin V 和 10 μ L 20g/L 的碘化丙啶,室温避光孵育 5 min 后送流式细胞仪检测细胞凋亡情况。活细胞为 FITC-/PI-,凋亡细胞为 FITC+/PI-,坏死细胞为 FITC+/PI+。

1.5 逆转录聚合酶链反应检测基因表达

收集对数生长期细胞,采用 Trizol 试剂提取样本总 RNA,根据逆转录试剂盒说明进行 RT-PCR,最后进行 PCR 扩增反应。根据目的基因的 mRNA 序列,采用 Primer 5.0 分析软件设计相应引物。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,68 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,68 $^{\circ}$ C 终末延伸 10 min,扩增 25 个或者 30 个循环。

1.6 阻断试验

在 EPC 中加入不同浓度的 Caspase 抑制剂,同时设立相应的对照,在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 1 h,用于阻断相应的分子,再加入 10 g/L 聚肌胞,37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h。CCK-8 细胞增殖试验检测细胞增殖情况。

1.7 抗体中和试验

在 EPC 中加入不同浓度的抗 IL-1R1 抗体,同时设立相应的对照,在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 1 h,用于封闭 IL-1R1 上的配体结合位点,再加入 10 g/L 聚肌胞,37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h。CCK-8 细胞增殖试验检测细胞增殖情况。

1.8 CCK-8 细胞增殖试验

消化收集贴壁的 EPC,调整细胞浓度至 3×10^7 /L,按每孔 100 μ L 接种于 96 孔培养板,每组设 3 个复孔。按照实验分组进行干预,培养 24 h 后每孔均加入 10 μ L CCK-8,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h 后运用酶联免疫检测仪测定 450 nm 吸光值(OD₄₅₀值)。

1.9 统计学分析

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 *t* 检验,实验

数据来自3次以上重复实验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 聚肌胞对细胞周期的影响

与阴性对照组比较, 1、10 g/L 聚肌胞处理组 S 期和 G2/M 期细胞比例显著减少, 而 G0/G1 期细胞

比例上升 ($P < 0.05$; 图 1A 和 1B); RT-PCR 结果显示, 聚肌胞下调细胞周期蛋白 A、B1、D1 和 E 的表达 (图 1C)。

2.2 聚肌胞对细胞凋亡的影响

与阴性对照组和阳性对照组比较, 聚肌胞对 EPC 有诱导凋亡的作用, 且随着浓度增加诱导凋亡的作用增强 (图 2)。

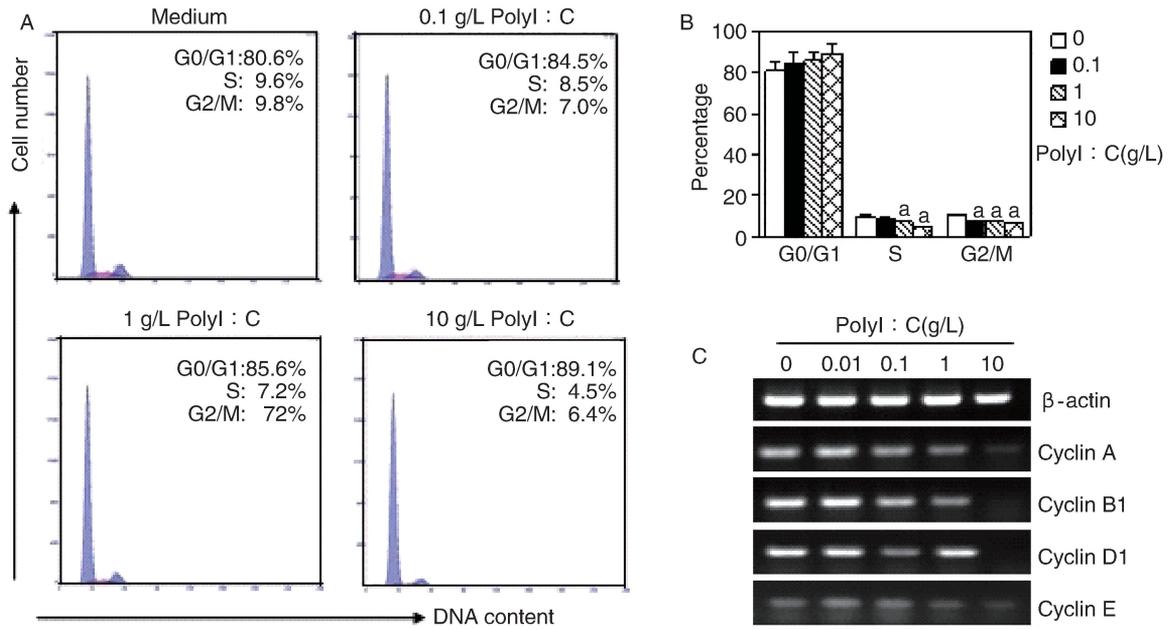


图 1. 聚肌胞对 EPC 细胞周期及细胞周期蛋白的影响 ($n = 3$) a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

Figure 1. Effect of PolyI : C on the cell cycles and cyclins in endothelial progenitor cells ($n = 3$)

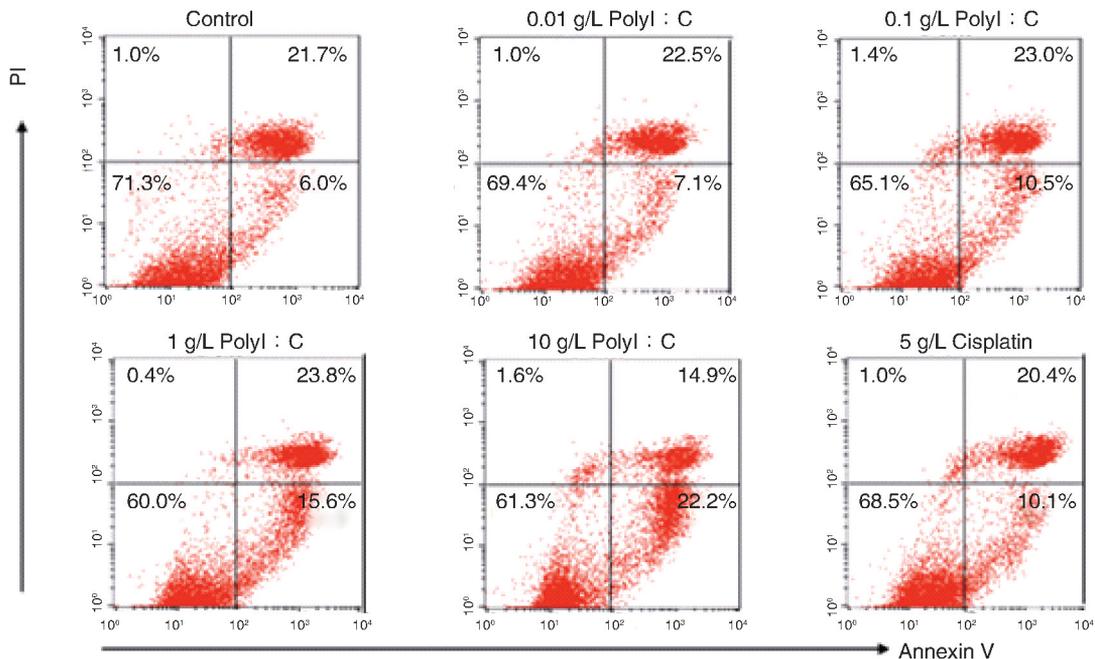


图 2. 不同浓度聚肌胞对 EPC 凋亡的影响

Figure 2. Effect of various concentrations of PolyI : C on the apoptosis of endothelial progenitor cells

2.3 聚肌胞不通过 Caspase 8 或 Caspase 9 途径诱导细胞凋亡

与相应对照组比较,随着 Caspase 8 抑制剂 Z-IETD-FMK 和 Caspase 9 抑制剂 Z-LEHD-FMK 浓度的增加,聚肌胞诱导的细胞凋亡率并未减少(图 3)。

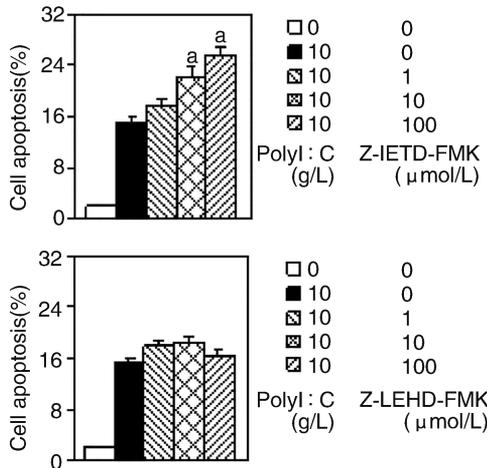


图 3. Caspase 8、Caspase 9 抑制剂对聚肌胞诱导 EPC 凋亡的影响(n=3) a 为 P<0.05,与聚肌胞 10 g/L 组比较。

Figure 3. Effect of Caspase 8 and Caspase 9 inhibitors on Poly I : C-induced apoptosis of endothelial progenitor cells(n=3)

2.4 TNF-α 对细胞凋亡的影响

与对照组比较,随着 TNF-α 作用浓度的增高,细胞凋亡率并无明显增加(图 4)。

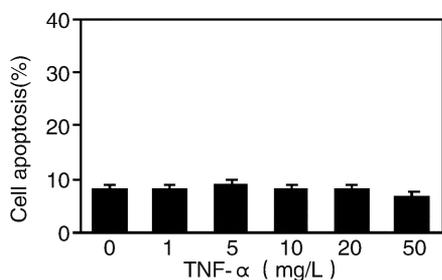


图 4. TNF-α 对 EPC 凋亡的影响

Figure 4. Effect of TNF-α on the apoptosis of endothelial progenitor cells

2.5 IL-1β 对细胞凋亡的影响

与对照组比较,随着 IL-1β 作用浓度的增高,细胞凋亡率逐步增加,并呈剂量依赖性(P<0.05;图 5A);而高浓度(20 g/L)的 anti-IL-1R1 可以部分抑制聚肌胞诱导的细胞凋亡(P<0.01;图 5B)。

3 讨论

目前普遍认为,内皮功能障碍是 As 形成的初始

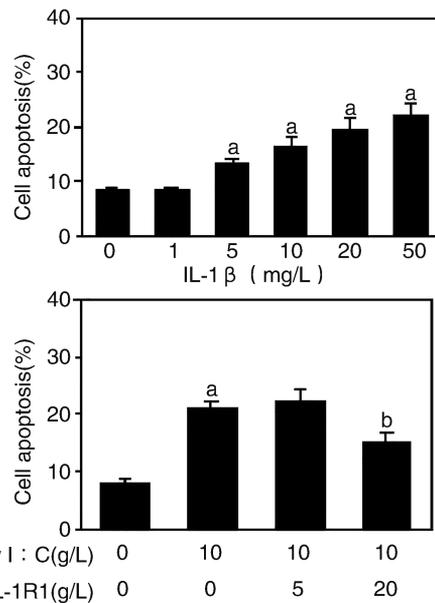


图 5. IL-1β 参与了聚肌胞诱导的 EPC 凋亡(n=3) a 为 P<0.05,b 为 P<0.01,与对照组比较。

Figure 5. IL-1β was involved in Poly I : C-induced apoptosis of endothelial progenitor cells

事件,而内皮功能障碍的本质是内皮损伤和修复之间动态平衡的破坏。EPC 作为内皮细胞的前体细胞,在维持内皮细胞功能的完整性与内皮损伤的修复中起重要作用。EPC 数量减少和功能下降会阻碍血管内皮的修复,导致内膜完整性破坏,为 As 的进展创造了前提条件,进而参与多种心血管系统疾病的发生和发展。EPC 的数量受多种因素的影响,其中细胞周期停滞及细胞凋亡是引起细胞增殖受限的重要机制。

细胞周期调控机制的核心是一组细胞周期依赖性蛋白激酶(cyclin dependent kinases, CDK),其时相性激活依赖于它们的调节亚基——细胞周期蛋白。在哺乳动物细胞中,细胞周期蛋白结合到 CDK4 形成复合物来调节细胞周期的转换^[4]。有研究报道,miR-383 的过表达通过下调细胞周期蛋白 D1 的基因转录,导致细胞周期阻滞于 G0/G1 期,从而抑制神经胶质瘤细胞 U251 和 U87 的增殖^[5]。钙调素拮抗剂 W-7 和 W-13 能将多种人多发性骨髓瘤细胞阻滞于 G0/G1 期,其机制与细胞周期蛋白 D1、D2、E1 的表达受抑相关^[6]。本研究为了证实聚肌胞抑制 EPC 增殖是否也涉及了对细胞周期的调控,采用 PI 单染法进行了细胞周期检测,结果发现高浓度(1、10 g/L)聚肌胞处理组 S 期和 G2/M 期细胞比例显著减少,而 G0/G1 期细胞比例上升,同时细胞周期蛋白 A、B1、D1、E 的基因转录随着聚肌胞作用浓度的增高而显著下调,说

明高浓度的聚肌胞通过抑制细胞周期素的表达将细胞周期滞留于 G0/G1 期,阻滞 EPC 进入合成期及分裂期,从而抑制 EPC 增殖。

研究表明,聚肌胞对某些细胞的增殖产生抑制作用,而在另一些细胞中,却能促进细胞增殖,其对细胞增殖的不同影响可能与细胞类型不同相关。例如,聚肌胞可以诱导多发性骨髓瘤细胞、乳腺肿瘤细胞凋亡^[7-8],而聚肌胞与一种合成的 TLR7/8 激动剂 R848 联合作用可诱导大鼠脊髓细胞一过性增殖^[9]。本研究证实,聚肌胞通过活化 TLR3 直接呈剂量依赖性诱导 EPC 凋亡。细胞凋亡的调节包括一系列复杂的级联反应,其中 Caspase 是凋亡反应的核心组件。目前研究最多的 Caspase 依赖的通路有两条,即外源性和内源性凋亡通路,其中分别涉及 Caspase 8 和 Caspase 9 的活化^[10-11]。为确定 Caspase 途径是否参与 TLR3 诱导的细胞凋亡,利用 Caspase 抑制剂的研究发现,Caspase 8 和 Caspase 9 的抑制剂并不能抑制聚肌胞诱导的细胞凋亡。与 Weber 等^[12] 研究发现聚肌胞通过 TLR3/TRIF/Caspase 8 信号途径诱导人黑色素细胞凋亡以及 Sun 等^[13] 研究发现 TLR3 经聚肌胞活化后通过内、外源性两条途径诱导人脐静脉内皮细胞凋亡等机制不同,本研究结果表明聚肌胞并不通过内、外源性凋亡途径诱导 EPC 凋亡。

近年研究发现,细胞因子是影响细胞凋亡的因素之一。多项国内外研究证实,TNF- α 、IL-1 β 作为两种重要的炎性细胞因子,可以通过不同信号途径直接诱导细胞凋亡。Zhang 等^[14] 研究报道,TNF- α 可以通过活化 p38MAPK 信号途径诱导神经胶质瘤细胞凋亡。Wang 等^[15] 发现 IL-1 β 能诱导新生雄性 SD 大鼠软骨细胞凋亡,而紫草素可以通过活化 PI3K/Akt 信号途径减弱 IL-1 β 对细胞凋亡的影响。本课题组前期研究证实聚肌胞活化 TLR3 后呈剂量依赖性上调炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 的基因表达,由此推测聚肌胞诱导的细胞凋亡是否与 TNF- α 和 IL-1 β 相关,进一步研究发现,EPC 经过浓度梯度的 TNF- α 干预后,由聚肌胞引起的 EPC 凋亡率并无明显增加,说明聚肌胞不通过 TNF- α 诱导细胞凋亡。而 IL-1 β 可呈剂量依赖性诱导 EPC 凋亡,且用 IL-1 β 受体的中和抗体 anti-IL-1R1 预先封闭 IL-1 β 的结合位点,再加入聚肌胞干预 24 h 后,anti-IL-1R1 可以部分抑制聚肌胞诱导的细胞凋亡,说明聚肌胞诱导的 EPC 凋亡与 IL-1 β 相关。与 Nestic 等^[16] 报道的大鼠脊髓挫伤后,损伤能通过上调炎症因子 IL-1 β 的表达而引起脊髓细胞凋亡的结果相似。

综上所述,聚肌胞作用于 EPC 后将细胞周期阻滞于 G0/G1 期,并诱导细胞凋亡从而抑制 EPC 增殖,其中并不通过内源性和外源性两条经典凋亡途径以及 TNF- α 引起细胞凋亡,而是通过活化 TLR3 诱导 EPC 分泌 IL-1 β 而介导 EPC 凋亡,说明病毒感染介导的炎症反应可以通过减少 EPC 数量在 As 的发生、发展中发挥重要作用,提示 TLR3、IL-1 β 将来可能作为新的治疗靶点用于 As 的药物治疗。由于 EPC 的凋亡并不能完全被 IL-1 β 受体的中和抗体 anti-IL-1R1 所抑制,说明除了 IL-1 β 外,尚有其他机制介导聚肌胞诱导的细胞凋亡,还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease[J]. *N Engl J Med*, 1999, 340 (2): 115-126.
- [2] Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology[J]. *Circ Res*, 2004, 95: 343-353.
- [3] 杨梅, 肖智林, 吕青山, 等. PolyI : C 对人脐血内皮祖细胞数量及功能的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19 (8): 668-674.
- [4] Stamatakis M, Palla V, Karaiskos I, et al. Cell cyclins: triggering elements of cancer or not[J]. *World J Surg Oncol*, 2010, 8: 111.
- [5] Xu Z, Zeng X, Tian D, et al. MicroRNA-383 inhibits anchorage-independent growth and induces cell cycle arrest of glioma cells by targeting CCND1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 453 (4): 833-838.
- [6] Yokokura S, Yurimoto S, Matsuoka A, et al. Calmodulin antagonists induce cell cycle arrest and apoptosis in vitro and inhibit tumor growth in vivo in human multiple myeloma[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 882.
- [7] 蒋廷旺, 熊怀民, 盛建华, 等. TLR3 途径诱导多发性骨髓瘤细胞株增殖抑制和凋亡机制研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2011, 31 (9): 815-818.
- [8] Salaun B, Coste I, Rissoan MC, et al. TLR3 Can Directly Trigger Apoptosis in Human Cancer Cells[J]. *J Immunol*, 2006, 176 (8): 4 894-901.
- [9] 苏艳华, 吕姝姝, 徐顺清. PolyI : C 与 R848 诱导大鼠脊髓细胞增殖的研究[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2008, 15 (2): 132-137.
- [10] Shi Y. Mechanisms of caspase inhibition and activation during apoptosis[J]. *Mol Cell*, 2002, 9 (3): 459-470.
- [11] Peter ME, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) DISC and beyond[J]. *Cell Death Differ*, 2003, 10 (1): 26-35.
- [12] Weber A, Kirejczyk Z, Besch R, et al. Proapoptotic signalling through Toll-like receptor-3 involves TRIF-dependent activation of caspase-8 and is under the control of inhibitor of apoptosis proteins in melanoma cells[J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17 (6): 942-951.
- [13] Sun R, Zhang Y, Lv Q, et al. Toll-like receptor 3 (TLR3) induces apoptosis via death receptors and mitochondria by up-regulating the transactivating p63 isoform alpha (TAP63alpha) [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (18): 15 918-928.
- [14] Zhang B, Wu T, Wang Z, et al. p38MAPK activation mediates tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in glioma cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11 (4): 3 101-107.
- [15] Wang L, Gai P, Xu R, et al. Shikonin protects chondrocytes from interleukin-1 beta-induced apoptosis by regulating PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8 (1): 298-308.
- [16] Nestic O, Xu GY, Mcadoo D, et al. IL-1 receptor antagonist prevents apoptosis and caspase-3 activation after cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2001, 18 (9): 947-956.

(此文编辑 文玉珊)