

文章编号: 1673-1689(2011)04-0588-04

反式脂肪酸 Trans C18: 1 诱导内皮细胞凋亡的研究

邱斌¹, 刘蓉¹, 邓泽元^{*1}, 范亚苇¹, 李静¹, 胡蒋宁¹, 黎玉²

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 南昌大学, 江西 南昌 330047; 2. 南昌大学 生命科学与食品工程学院, 江西 南昌 330047)

摘要: 通过检测相关细胞凋亡指标, 探讨 trans C18: 1 诱导内皮细胞的凋亡机制。采用体外细胞培养方法将不同浓度 trans C18: 1 与内皮细胞共同孵育后, 通过吉姆萨染色, 观察内皮细胞形态变化; 采用流式细胞仪检测细胞的早期凋亡变化; 通过试剂盒检测观察 trans C18: 1 对凋亡酶 Caspase 活力的影响; 最后考察 Caspase 抑制剂 z-VAD-fmk, 对 trans C18: 1 对内皮细胞存活率的影响。吉姆萨染色后, 细胞呈典型的凋亡形态; 流式细胞仪检测内皮凋亡细胞的数量明显增加; 同时发现 trans C18: 1 引起内皮细胞的凋亡可能与 Caspase-3 酶激活有关, 因为 Caspase 抑制剂又能提高 trans C18: 1 处理的内皮细胞存活率。

关键词: 反式脂肪酸; trans C18: 1; 内皮细胞; 凋亡

中图分类号: R 151. 41

文献标识码: A

Apoptosis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced by Trans C18: 1

QIU Bin¹, LIU Rong¹, DENG Ze-yuan^{*1}, FAN Ya-wei¹,
LI Jing¹, HU Jiang-ning¹, LI Yu²

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. School of Life Sciences and Food Engineering, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The target of this study is to explore the apoptotic mechanism of endothelial cells through detecting relevant apoptosis index. For this, EC were cultured with trans C18: 1 at different concentrations, then the morphological changes of endothelial cells were observed through giemsa staining. The apoptotic cells were detected by flow cytometry. The activity of caspase-3 was detected by spectrophotography after endothelial cells treated with trans C18: 1. The cell viability was measured by MTT after endothelial cells cultured with trans C18: 1 and caspase inhibitor for 24~48 h. Results: The number of apoptotic cells raised and endothelial cells displayed classical apoptotic morphology after endothelial cells cultured with trans C18: 1. The activity of caspase 3 ascended and the caspase inhibitor could protect endothelial cells from trans C18: 1.

Key words: trans fatty acids, trans C18: 1, endothelial cell, apoptosis

收稿日期: 2010-08-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(30972482), 江西省学术带头人计划项目(2008DD00900), 教育部博士点基金项目(20070403002), 江西省自然科学基金项目(2008GQY0023)。

作者简介: 邱斌(1982-), 男, 山东肥城人, 食品科学与工程博士研究生, 主要从事食品营养学研究。Email: 422083898@qq.com

* 通信作者: 邓泽元(1963-), 男, 江西瑞金人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事脂肪酸研究。

Email: dengzy28@yahoo.com.cn

反式脂肪酸(trans fatty acids, TFA) 是油脂或含有油脂的食品中常见的一个组成成分^[1]。由于 TFA 会加速动脉粥样硬化, 容易诱发心血管和老年痴呆等疾病。因此, 食品中的 TFA 的形成已成为当前国际上的研究热点^[2]。人摄入 TFA 后, 会引发系统炎症和内皮功能改变, 并进一步诱发心血管疾病的发生和发展, 但具体的机制目前仍不清楚。

研究表明, 内皮凋亡是血管损伤的重要作用机制, 许多外界刺激均可诱导内皮凋亡, 并进一步导致血管渗漏, 炎症和血液凝固^[3]。作者已发现 trans C18:1 会造成内皮细胞损伤^[4], 现探讨 trans C18:1 对内皮细胞凋亡的影响, 希望为研究 TFA 引起的动脉粥样硬化的发生机制提供科学的数据。

1 材料与方 法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞株: 南昌大学医学院提供; trans C18:1(反式 9 十八碳烯酸)、DMEM、胰蛋白酶 MTT: Sigma 公司产品; 吉姆萨试剂盒: 南京建成公司产品, 酶标仪 MK3: Thermo 公司产品, Caspase-3 试剂盒、Caspase 广谱抑制剂 z-VAD-fmk: Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒: 南京凯基生物公司产品; 流式细胞仪 COULTER EPICS XL: BECKMAN 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人脐静脉内皮细胞的培养: 取人脐静脉血管内皮细胞细胞株复苏, 接种于 50 mL 培养瓶内, 待生长铺满后, 经 2.5 g/L 胰蛋白酶消化传代, 置于 37 °C、体积分数 5% 的 CO₂ 培养箱培养。隔天换培养液, 培养第 3 天分组。

1.2.2 吉姆萨染色 待细胞铺满 90% 以上时, 弃去培养皿内原培养液, 用 PBS 冲洗 3 次后加吉姆萨染色液 iv 染液 3~5 滴, 使其迅速盖满皿底, 大约 1 min 后滴加试剂 ① 缓冲液 5~10 滴, 轻轻摇动平皿, 使染液充分混合均匀, 5~10 min 后用超纯水迅速冲去多余染液, 晾干后在倒置相差显微镜下观察细胞形态。

1.2.3 Annexin V-FITC 双染法检测细胞凋亡 trans C18:1 处理过的内皮细胞用不含 EDTA 的胰酶消化, 然后用 PBS 洗涤细胞两次(2 000 r/min 离心 5 min) 收集 1.5×10^5 细胞, 加入 500 μ L 的 Binding Buffer 悬浮细胞, 加入 5 μ L Annexin V-FITC 混匀后, 再加入 5 μ L Propidium Iodide 混匀, 室温、避光、反应 5~15 min, 在 1 h 内进行流式细胞仪的观察和检测。

1.2.4 Caspase-3 活性的检测 按试剂盒说明操作, 胰酶消化收集 trans C18:1 处理过的内皮细胞并重悬于 Lysis Buffer(裂解液)中, 冰上孵育 10 min, 离心并收集上清液(胞浆提取液), 加入含 DDT 的 Reaction Buffer, 再加 5 μ L 蛋白酶底物多肽 37 °C 孵育 4 h, 在酶标仪 405 nm 处检测光密度值。结果以检测的 A 值表示。

1.2.5 Caspase 抑制剂对内皮细胞存活率的影响

将细胞以 1×10^5 /mL 接种于 96 孔板中, 每孔加入细胞悬液 100 μ L, 待细胞长到融合。分别设立空白对照组, trans C18:1(200 μ mol/L) 组, Caspase 抑制剂 1.25、2.5、5 μ mol/L Caspase 抑制剂组中都同时添加 trans C18:1(200 μ mol/L), 10 μ mol/L Caspase 抑制剂组不添加 trans C18:1, 每个浓度 6 个复孔。37 °C、体积分数 5% CO₂ 孵箱内培养 24 或 48 h 后, 去除培养液, 每孔加入 0.5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 μ L, 继续培养 4 h 后, 弃去上清液, 每孔加入 150 μ L 二甲基亚砜(DMSO), 震荡使蓝紫色结晶充分溶解, 用酶标仪测定 A_{490 nm} 值。计算各浓度 Caspase 抑制剂对细胞存活率的影响。

$$\text{存活率}(\%) = (A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$$

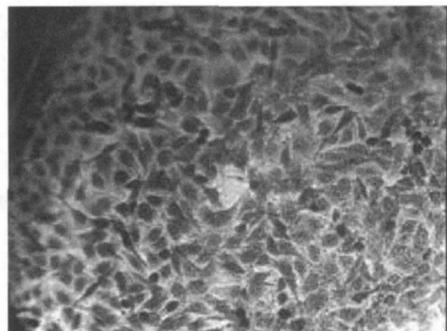
1.3 统计分析

所有实验数据用 SPSS for windows 软件进行数据分析。

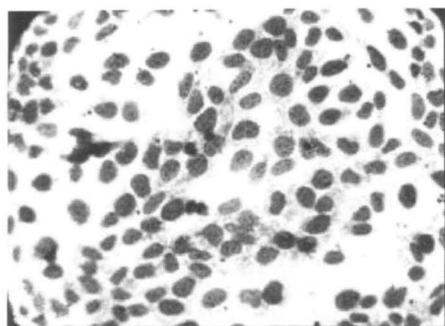
2 结果与分析

2.1 trans C18:1 诱导内皮细胞凋亡的形态学观察

如图 1 所示, 经吉姆萨染料着色后的细胞核呈紫红色, 而细胞浆着色不明显, 呈淡红色。对照组细胞轮廓清晰, 呈多角形“铺路石样”排列; 核居中, 为圆形或椭圆形。经 200 μ mol/L trans C18:1 作用 24 h 后, 胞质明显回缩, 细胞间连接消失, 胞体呈圆形; 胞核浓缩深染, 偏于一侧, 部分核已破裂, 呈现出凋亡细胞典型的形态学特征。



(a) (200 \times) 对照



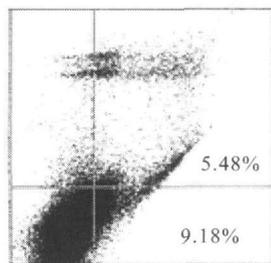
(b) (200×)200 μmol/L trans 18:1

图1 吉姆萨染色显示内皮细胞形态变化

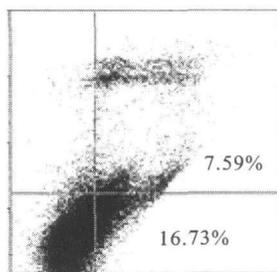
Fig. 1 Morphological changes shown by Gimera staining

2.2 Annexin V-FITC 法检测 trans C18:1 诱导内皮细胞凋亡

在细胞凋亡早期,位于细胞膜内侧的磷脂酰丝氨酸(PS)迁移至细胞膜外侧。Annexin V 是一种钙依赖性的磷脂结合蛋白,与 PS 具有高度的结合力。因此,Annexin V 可以作为探针检测暴露在细胞外侧的 PS。将 Annexin V 标记上绿色荧光蛋白 FITC,同时结合核酸染料 PI(活细胞未染)进行细胞双染,可区分活细胞、凋亡及死亡细胞。图 2 显示,对照组出现少量凋亡细胞(图 2(a)); trans C18:1 组,早期凋亡率为 16.73%(图 2(b)),比对照组有明显增加。



(a) 对照



(b) 200 μmol/L trans 18:1

图2 trans C18:1 对内皮细胞凋亡率的影响

Fig. 2 Effect of trans C18:1 on apoptosis rate

2.3 trans C18:1 对 Caspase-3 活性的影响

Caspase-3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶,在细胞凋亡中起着不可替代的作用^[5]。如图 3 所示,Caspase-3 活性可被 trans C18:1 激活,

trans C18:1 (200 μmol/L) 与对照组相比 Caspase-3 活力有显著升高($p < 0.001$)。

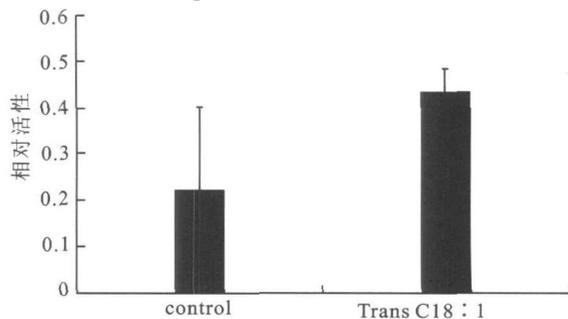


图3 trans C18:1 对内皮细胞 Caspase-3 活性的影响

Fig. 3 Effect of trans C18:1 on the activity of Caspase-3

2.4 Caspase 抑制剂对 trans C18:1 处理的内皮细胞存活率的影响

Caspase 抑制剂对 trans C18:1 处理的内皮细胞存活率的影响结果见图 4。将 Caspase 抑制剂 z-VAD-fmk 加入培养基中,trans C18:1 作用 24~48 h 后,发现 Caspase 抑制剂预处理组的内皮细胞存活率比仅 trans C18:1 处理组明显升高($p < 0.001$),且与对照组和单独添加 Caspase 抑制剂相比无统计学差异。

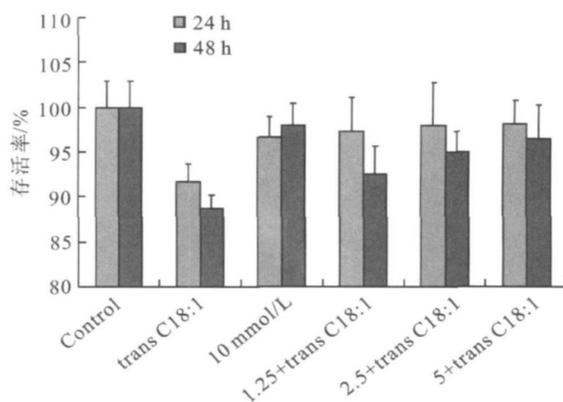


图4 Caspase 抑制剂对细胞存活率的影响

Fig. 4 Effect of Caspase inhibitor on cell viability

3 结 语

众多研究表明^[6-7],在细胞凋亡的过程中,Caspase 家族在其信号转导系统中起着非常重要的作用,其中 Caspase-3(胱氨酸蛋白酶 3)为关键的信息分子^[8]。正常情况下,胞质中 Caspase-3(胱氨酸蛋白酶 3)以无活性、相对分子质量约为 32 000 的前 Caspase-3 的形式存在。当细胞凋亡过程被启动,凋亡信号传导至 Caspases 时,可引起各种 Caspases 的“瀑布式”层层激活的蛋白酶级联切割的过程,不

同的蛋白酶分别切割 Caspase-3 酶原,从而激活 Caspase-3,活化的 Caspase-3 进一步又切割不同的底物,导致蛋白酶级联切割放大,最终引起细胞凋亡^[9]。而在此蛋白酶级联切割过程中,Caspase-3 处于核心位置,发挥重要的作用,因此被称为死亡蛋白酶。

作者发现,在反式脂肪酸诱导内皮凋亡的过程中,Caspase-3 活性显著升高,表明 Caspase-3 参与了内皮细胞的凋亡。Caspase 抑制剂可通过提高 trans C18:1 处理的内皮细胞存活率抑制内皮的细

胞凋亡。Michaela Artwohl 发现硬脂酸通过激活 Caspase 诱导内皮细胞凋亡,并且 Caspase 抑制剂可以完全抑制硬脂酸诱导的内皮细胞凋亡^[10],其结果和作者的研究结果一致。Yumi Kondoh 发现 trans C18:1 能够激活 Caspase-3 且部分激活 Caspase-8,-9,诱导人肝癌细胞株(HepG2) 凋亡^[11],说明死亡受体通路和线粒体通路均部分参与了 trans C18:1 诱导的 HepG2 细胞凋亡过程。TFA 通过什么通路引起血管内皮细胞的凋亡,需要进一步深入研究。

参考文献(References):

- [1] 邓泽元,周潇奇,黄玉华,等. 中国居民 20 年间食物脂肪摄入量调查分析[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27: 7-19.
DENG Ze-yuan, ZHOU Xiao-qi, HUANG Yu-hua, et al. Investigation of dietary fatty acids intakes of Chinese people during twenty years[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2008, 27: 7-19. (in Chinese)
- [2] 陈宜,张青龄,林丛,等. 食品中反式脂肪酸的研究进展[J]. 食品科技, 2009, 16(5): 25-28.
CHEN Yi, ZHANG Qing-ling, LIN Cong, et al. Research progress on trans fatty acids in food[J]. *Cereal and food industry*, 2009, 16(5): 25-28. (in Chinese)
- [3] Winn RK, Harlan JM. The role of endothelial cell apoptosis in inflammatory and immune diseases[J]. *Thromb Haemost*, 2005, 3: 1815-24.
- [4] 邱斌,刘蓉,邓泽元,等. 反式 C18:1 对血管内皮细胞损伤的影响[J]. 营养学报, 2010, 32: 328-335.
QIU Bin, LIU Rong, DENG Ze-yuan, et al. Effects of trans C18:1 on endothelial injury[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2010, 32: 328-335. (in Chinese)
- [5] Ostergard T, Hansen TK, Nyholm B, et al. Circulating ghrelin concentrations are reduced in healthy offspring of type 2 diabetic subjects and are increased in Women independent of a family history of type 2 diabetes[J]. *Diabetologia*, 2003, 46(1): 134-136.
- [6] Du HJ, Hui YN, Wang YS, et al. Caspase-3 activity during daunorubicin induced human retinal pigment epithelium cell apoptosis[J]. *Disi Junyi Daxue Xuebao*, 2001, 22(7): 609-611.
- [7] Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death[J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1317-1322.
- [8] Duan H, Chinnaiyan AM, Hudson PL, et al. ICE-LAP3, a novel mammalian homologue of the caenorhabditis elegans cell death protein C_{el}3 is activated during Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis[J]. *Biol Chem*, 1996, 271(3): 1621-1625.
- [9] Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, et al. A caspase-activated DNase that degraded DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD[J]. *Nature*, 1998, 391: 43-50.
- [10] Artwohl M., Lindenmair A, et al. Different mechanisms of saturated versus polyunsaturated FFA-induced apoptosis in human endothelial cells[J]. *J Lipid Res*, 2008, 49(12): 2627-2640.
- [11] Yumi Kondoh, Teruo Kawada, Reiko Urade. Activation of caspase 3 in HepG2 cells by elaidic acid (t18:1) [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 17(71): 500-505.