

[文章编号] 1000 - 4718(2007)11 - 2100 - 03

# Ang II 致内皮细胞凋亡中多聚(ADP - 核糖)聚合酶活性变化的研究\*

杨丽霞, 郭瑞威, 王红, 郭传明, 齐峰, 石燕昆

(成都军区昆明总医院心血管内科, 云南昆明 650032)

**[摘要]** 目的: 探讨体外 Ang II 在引起血管内皮细胞凋亡过程中细胞内多聚(ADP - 核糖)聚合酶的活性变化情况。方法: 1  $\mu\text{mol/L}$  的 Ang II 处理原代培养人脐静脉内皮细胞 6、12、24 和 48 h 后, 用 TUNEL 法来检测内皮细胞的凋亡, 用 [ $^3\text{H}$ ] 掺入法来检测 PARP 的活性, 硝酸还原法检测 NO 含量。结果: 1  $\mu\text{mol/L}$  的血管紧张素 II 以时间依赖性引起内皮细胞的凋亡, 6 h 后细胞内的 NO 含量开始增加 ( $P < 0.05$ ), 24 h 达到高峰, 48 h 后下降到对照组水平; 6 h 后 PARP 的活性上升 ( $P < 0.05$ ), 12 h 到达高峰, 24 h 接近正常, 48 h 后 PARP 的活性显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。结论: NO 含量增加导致的细胞毒性在血管紧张素 II 引起内皮细胞的凋亡中有着重要的作用, 在这一过程中 PARP 活性的变化是先上升后下降。

**[关键词]** 多聚(ADP - 核糖)聚合酶; 血管紧张素 II; 内皮细胞; 细胞凋亡; 一氧化氮

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

## Role of PARP in endothelial cell apoptosis induced by angiotensin II

YANG Li - xia, GUO Rui - wei, WANG Hong, GUO Chuan - ming, QI Feng, SHI Yan - kun

(Department of Cardiology, Kunming General Hospital of Chengdu Army, Kunming 650032, China. E - mail: grw771210@163.com)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To explore the role of poly - (ADP - ribose) polymerase (PARP) in the cultured endothelial cell apoptosis induced by angiotensin II. **METHODS:** The cultured endothelial cells were treated with angiotensin II at concentration of 1  $\mu\text{mol/L}$ . The apoptosis of endothelial cells was assessed by TUNEL. Meanwhile, the activity of PARP and the content of nitric oxide (NO) were also measured. **RESULTS:** Angiotensin II induced apoptosis in endothelial cells in a time - dependent manner. The content of NO begun to increase at 6 h ( $P < 0.05$ ), and peaked at 24 h. The activity of PARP also increased at 6 h ( $P < 0.05$ ), peaked at 12 h, and was lower than that in the control at 48 h ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION:** The cytotoxicity of NO has a relevant role in apoptosis of endothelial cells induced by angiotensin II, and can increase the activity of PARP.

**[KEY WORDS]** Poly - (ADP - ribose) polymerase; Angiotensin II; Endothelial cells; Apoptosis; Nitric oxide

多聚(ADP - 核糖)聚合酶[poly - (ADP - ribose) polymerase, PARP]广泛存在于真核细胞核内, 具有蛋白修饰和核苷酸聚合作用。环境刺激、自由基或氧化剂和基因毒性介质所引起的 DNA 链的缺口或断裂均可引起 PARP 活化。PARP 在机体中的作用有赖于 DNA 的损伤程度, 少量的 DNA 损伤引起的 PARP 活化时, 通过裂解底物  $\text{NAD}^+$  生成 ADP - 核糖, 引起包括 PARP 自身在内的多种蛋白酶发生多聚(ADP - 核糖)基化, 参与 DNA 链的修复; 但大

量 DNA 损伤时 PARP 过度活化, 利用  $\text{NAD}^+$  形成大量的(ADP - 核糖)聚合物, 利用尼克酰胺重新生成  $\text{NAD}^+$  时将消耗 ATP, 能量耗竭将使细胞严重损伤最终导致细胞死亡<sup>[1]</sup>。我们的前期研究表明, 血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 在导致血管内皮细胞凋亡时, 引起了诱导型一氧化氮合酶表达的上调, 使得大量的 NO 产生, 体内 NO 可以被氧化成为过氧化亚硝酸盐, 后者可以激活 PARP, 本研究旨在观察在血管紧张素 II 致血管内皮细胞凋亡过程中 PARP 活

[收稿日期] 2006 - 03 - 28 [修回日期] 2006 - 07 - 25

\* [基金项目] 云南省自然科学基金资助项目 (No. 2001C0070M)

Tel: 0871 - 4074573; E - mail: grw771210@163.com

性的变化情况和 NO 含量。

## 材 料 和 方 法

### 1 主要试剂

血管紧张素 II 购于 Sigma 公司; DMEM 购于 Gibco 公司; 胎牛血清购于 Hyclone 公司; NO 检测试剂盒为南京建成产品; TUNEL 凋亡试剂盒购于中衫公司;  $[4-^3\text{H}]$ NAD 购于 Amersham 公司。

### 2 人脐带静脉内皮细胞的培养和分组

参照 Madan 等<sup>[2]</sup>方法分离人脐带静脉内皮细胞, 后加入含 200 mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养液, 于 50 mL/L  $\text{CO}_2$ 、37 °C 条件下培养。观察原代培养内皮细胞 80% 以上汇合时按  $10^8$  cells/L 传代, 取第 2-4 代细胞用于实验。用终浓度为  $1 \mu\text{mol/L}$  Ang II 分别干预培养的内皮细胞, 在干预后 6、12、24 和 48 h 分别测定细胞 NO 含量、PARP 的活性和凋亡指数变化。

### 3 细胞内 NO 的检测

消化下来的细胞用 PBS 清洗后, 用生理盐水配成浓度为  $10^9$  cells/L, 反复冻融 3 次后, 测定蛋白的浓度, 按试剂盒说明操作, 测定出吸光度,  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  含量 = (测定管吸光度 - 空白管吸光度) / (标准管吸光度 - 空白管吸光度) × 标准品浓度 / 样本的蛋白含量。

### 4 细胞内 PARP 活性的测定

其原理是: PARP 以尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 为底物, 催化其裂解为腺苷二磷酸核糖基和尼克酰胺, 并将前者转移到受体蛋白的谷氨酸残基上, 形成 1 条腺苷二磷酸核糖基的聚合链。用同位素  $[^3\text{H}]$  预先标记 NAD, 同位素会掺入到腺苷二磷酸核糖基聚合链上, 该聚合体存在于细胞核不溶于酸的组分中, 通过测定此组分中的比放射性强度, 便可测得 PARP 的活性。参照 Szabo 等<sup>[3]</sup>方法进行。

### 5 TUNEL 检测凋亡细胞

制备细胞爬片, 4% 的多聚甲醛固定 30 min, PBS 冲洗后 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  封闭内源性过氧化物酶 30 min, 后用 0.1% Triton X-100 在 4 °C 渗透 2 min, PBS 冲洗后加 TUNEL 反应混合液 50  $\mu\text{L}$ , 37 °C 60 min 后 PBS 冲洗, 转化剂 POD 50  $\mu\text{L}$ , 37 °C 45 min, PBS 冲洗后 DAB 显色, 光镜下分析结果, 每个片子取 3 个视野 ( $\times 200$ ), 凋亡细胞占总细胞的百分比为凋亡指数。

### 6 统计学处理

用 SPSS 11.0 对数据进行处理, 多组间进行单因素方差分析。数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 结 果

### 1 鉴定人脐静脉内皮细胞

培养的人脐静脉内皮细胞, 在相差显微镜下鉴定, 大部分细胞贴壁生长。早期细胞呈小多角、球形、呈团状, 逐渐生长成梭形, 于 4-7 d 胞体呈多角形, 相互嵌合, 为单层呈铺路石状排列, 荧光抗体法表明胞浆内有 VIII 因子相关抗原, 见图 1。

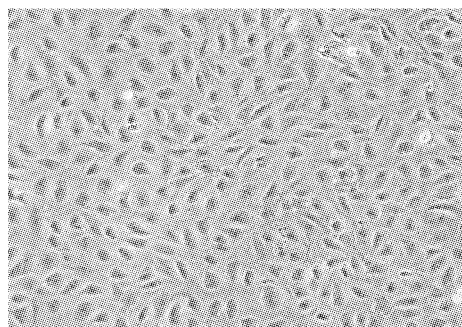


Fig 1 Humen umbilicai vein endothelial cell ( $\times 200$ ).

图 1 培养的人脐静脉内皮细胞 (相差显微镜)

### 2 Ang II 对细胞内 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量的影响

细胞培养基中加入 Ang II (终浓度为  $1 \mu\text{mol/L}$ ) 6、12、24 h 后, 细胞内的  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  含量逐渐增加, 与对照组有显著差异 ( $P < 0.05$ ); 48 h 后细胞内  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  含量接近对照组水平, 见图 2。

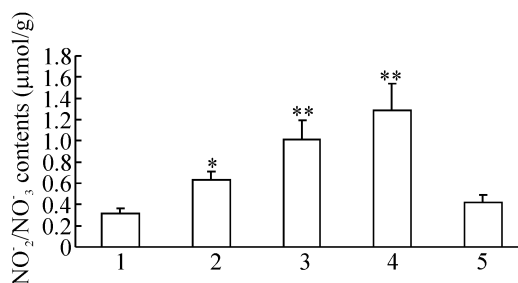


Fig 2 Influence of Ang II on  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  contents.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 3$ .

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group. 1: control; 2-5: 6, 12, 24 and 48 h after treated with Ang II ( $1 \mu\text{mol/L}$ ).

图 2 Ang II 干预内皮细胞后  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  的含量

### 3 Ang II 对细胞内 PARP 活性的影响

在细胞培养基中加入  $1 \mu\text{mol/L}$  的 Ang II, 6 h 后 PARP 的活性上升, 与对照组有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 12 h 到达高峰, 24 h 接近正常, 48 h 后 PARP 的活性显著低于对照组 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。

### 4 Ang II 对细胞凋亡的影响

浓度为  $1 \mu\text{mol/L}$  的 Ang II 干预内皮细胞 12 h 后 TUNEL 法检测示内皮细胞的凋亡指数显著高于对照组, 24 h 和 48 h 后细胞凋亡指数增加更为明显, 见图 4。

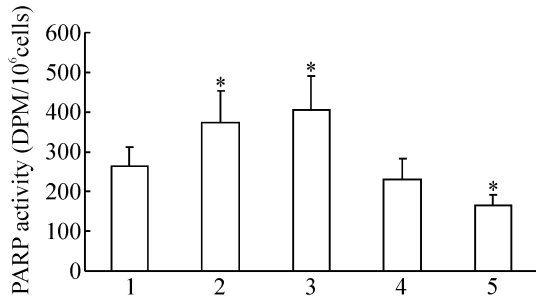


Fig 3 Influence of Ang II on PARP activity.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs control group. 1: control; 2-5: 6, 12, 24 and 48 h after treated with Ang II (1  $\mu\text{mol/L}$ ).

图 3 Ang II 干预内皮细胞后 PARP 的活性变化

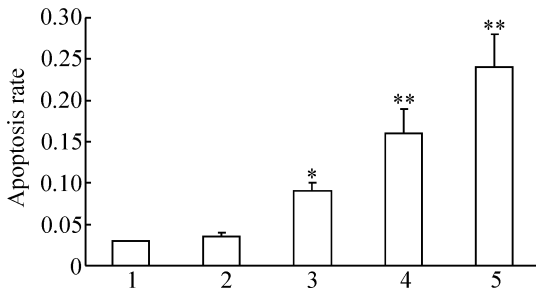


Fig 4 Influence of Ang II on EC apoptosis.  $\bar{x} \pm s$ .  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group. 1: control; 2-5: 6, 12, 24 and 48 h after treated with Ang II (1  $\mu\text{mol/L}$ ).

图 4 Ang II 对内皮细胞凋亡的影响

## 讨 论

Ang II 作为一个重要的炎性因子,干预体内重要的生理反应,在病理条件下,因为肾素-血管紧张素系统的激活导致体内大量 Ang II 的生成<sup>[4]</sup>。大量的 Ang II 将引起体内一系列的病理反应<sup>[5]</sup>,包括加重炎症反应、诱导凋亡的发生等<sup>[6]</sup>。在 Ang II 引起细胞凋亡的过程中有较多的信号通路参与,其中诱导型一氧化氮合酶的激活是一个重要的过程,大量的一氧化氮产生可以与氧自由基形成过氧化亚硝酸盐,后者会导致严重的细胞毒性反应<sup>[7]</sup>,我们研究表明在血管紧张素 II 干预下,内皮细胞中的一氧化氮含量随之增加,在 24 h 达到高峰,48 h 恢复到正常水平。

PARP 是一个位于核内分子量为 113 kD 蛋白酶,包含有 3 个功能区:即 N 末端的 DNA 结合域、C 末端的催化域和位于酶蛋白中间的自身修饰域。它主要功能是修复被损伤 DNA,因此当 DNA 发生损伤时,PARP 的活化是细胞的一个防御机制<sup>[1]</sup>。PARP 是 caspases 家族的一个下游反应物,在细胞凋亡发生的过程中,PARP 被 caspase-3 裂解成为 2 个片段,89 kD 和 24 kD,前者在产生后随之游出细胞核,检测 89 kD 可以作为细胞发生凋亡的一个指标,后者包含有 DNA 结合区域,产生后仍留在细胞核内与保持着

DNA 结合活性,可以与 PARP 竞争 DNA 结合从而加速细胞凋亡的发生<sup>[8]</sup>。但同时 PARP 的过度激活将会消耗大量的 ATP,导致细胞内能量耗尽,最终细胞死亡,应用 PARP 的抑制剂可以起到保护作用。本研究表明 Ang II 可以时间依赖性地引起内皮细胞凋亡,在整个过程中 PARP 活性在 6 h 开始上调,12 h 达到高峰,24 h 接近正常。PARP 开始阶段的活性上调可能是因为:当大量 Ang II 与其受体 AT<sub>1</sub> 结合后,激活 NAD(P)H 氧化酶产生大量 ROS,然后 NO 再与活性氧结合生成具有细胞毒性的 ONOO<sup>-</sup>,这些细胞毒性物质直接造成了 DNA 的损伤,从而激活了 PARP。在后期过程中,可能是因为 Ang II 激活了 caspases 家族造成了 PARP 大量的裂解,从而活性降低。Soldani 等<sup>[9]</sup>研究表明 PARP 的前期激活对后期的活性下降有着自身调节作用,如果在前期限制了 PARP 的激活,就可以避免后期活性降低的发生和细胞的凋亡。因此应用 PARP 抑制剂可以起到一定的细胞保护作用。

## [参 考 文 献]

- [1] Koh DW, Dawson TM, Dawson VL, et al. Mediation of cell death by poly (ADP - ribose) polymerase - 1 [J]. Pharmacol Res, 2005, 52 (1): 5 - 14.
- [2] Madan B, Singh I, Kumar A, et al. Xanthenes as inhibitors of microsomal lipid peroxidation and TNF - alpha induced ICAM - 1 expression on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) [J]. Bioorg Med Chem, 2002, 10(11): 3431 - 3436.
- [3] Szabo C, Zingarelli B, Salzina AL. Role of poly - ADP ribosyltransferase activation in the vascular contractile and energetic failure elicited by exogenous and endogenous nitric oxide and peroxynitrite [J]. Circ Res, 1996, 78(6): 1051 - 1063.
- [4] 李宝玉, 高颖, 张建英, 等. Ang II 对大鼠胚心成纤维细胞的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(1): 89 - 91.
- [5] 赵亚莉, 张智国, 刘洁, 等. PKC $\zeta$  与 Raf 在 Ang II 引起的大鼠血管平滑肌细胞 ERK1/2 活化中的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(1): 35 - 39.
- [6] Suzuki Y, Ruiz - Ortega M, Lorenzo O, et al. Inflammation and angiotensin II [J]. Int J Biochem Cell, 2003, 35 (6): 881 - 900.
- [7] Schmidt - Ott KM, Kagiyama S, Ianphillips M. The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis [J]. Peptides, 2000, 93(1): 65 - 77.
- [8] Quesada P, Malanga M, Meglio SD, et al. Recombinant IFN -  $\alpha$  2b treatment activates poly (ADPR) polymerase - 1 (PARP - 1) in KB cancer cells [J]. Eur J Cancer, 2003, 39(14): 2103 - 2109.
- [9] Soldani C, Lazze MC, Bottone MG, et al. Poly (ADP - ribose) polymerase cleavage during apoptosis: when and Where [J]. Exp Cell Res, 2001, 269(2): 193 - 201.