

# Caspases 在缺氧性脑微血管内皮细胞凋亡中的作用

张建军\* , 石瑞丽\*\*

(中国医学科学院·中国协和医科大学 药物研究所, 北京 100050)

**摘要:** 目的 研究 caspases 在缺氧性脑微血管内皮细胞凋亡中的作用。方法 用氰化钠合并无糖培养基造成培养的牛脑微血管内皮细胞缺氧;用台盼蓝染色、TUNEL 及流式细胞仪计数方法观察细胞受损和凋亡情况;用免疫细胞化学染色法观察受损细胞中 caspase-3 的表达。结果 氰化钠合并无糖培养基可损伤牛脑微血管内皮细胞,使细胞发生凋亡,受损细胞中 caspase-3 大量表达。广谱 caspases 抑制剂、选择性 caspase-1、-3 和-6 抑制剂均能显著减少细胞死亡数目,caspase-1 和-6 抑制剂可以抑制 caspase-3 的表达。结论 Caspases 在缺氧性脑微血管内皮细胞凋亡过程中起重要作用,在 caspases 的蛋白酶级联切割反应中 caspase-3 位于 caspase-1 和-6 的下游。

**关键词:** 脑微血管内皮细胞; 缺氧; 凋亡; 半胱氨酸蛋白酶抑制剂

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2003)10 - 0739 - 04

## Effects of caspases on cerebrovascular endothelial cell apoptosis induced by hypoxia

ZHANG Jian-jun\* , SHI Rui-li\*\*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** **Aim** To study the effects of caspases on cerebrovascular endothelial cell apoptosis induced by hypoxia *in vitro*. **Methods** The cultured bovine cerebrovascular endothelial cells were exposed to NaCN in glucose-free medium. Cell viability was determined by trypan blue staining. Cell apoptosis was defined by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick endlabeling (TUNEL) and flow cytometry. The expression of caspase-3 was detected by immunocytochemical method. Four caspase inhibitors were used to validate the effect of caspases on cell apoptosis. **Results** NaCN in glucose-free medium initiated cerebrovascular endothelial cell injury markedly and typical apoptotic cells were found in this model. The expression of caspase-3 increased significantly. Four caspase inhibitors decreased the number of injured cells. Selective inhibitor of caspase-1 and -6 reduced expression of caspase-3 significantly. **Conclusion** The results suggest that caspases family plays an important role in cerebrovascular endothelial cell apoptosis induced by NaCN and caspase-3 acts on the downstream of caspase-1 and -6 in protease cascade action to induce apoptosis.

**Key words:** cerebrovascular endothelial cell; hypoxia; apoptosis; caspase inhibitor

缺血缺氧是许多血管性疾病中常见的病理现象,可致血管内皮细胞(VEC)死亡。近年来利用 caspases 抑制剂阻断凋亡的研究得到广泛重视<sup>[1,2]</sup>,

但关于缺血缺氧状态下细胞凋亡机制的研究多集中在神经细胞和心肌细胞,对微血管内皮细胞的研究较少。本实验检测了缺氧性脑微血管内皮细胞凋亡时 caspase-3 的表达,还观察了 caspase-1 和-6 的选择性抑制剂对 caspase-3 表达的影响,希望能进一步明确 caspases 家族成员参与缺氧性血管内皮细胞凋亡的分子机制,为研制保护血管内皮的药物进行有益的探索。

收稿日期: 2002-12-25.

\* 通讯作者 Tel: 86 - 10 - 63182392, Fax: 86 - 10 - 63037757,

E-mail: jjzhang@imm.ac.cn

\*\* 现址: 内蒙古包头医学院中药研究室

## 材料和方法

**试剂与药品** Z-DEVD-fmk, Z-YVAD-fmk, Z-VAD-fmk 和 Z-VEID-fmk 为美国 Enzymes Systems Products 产品;高糖及无糖 DMEM 培养基和胶原酶为 Gibco 产品;胎牛血清(FBS)为 Hyclone 产品;NaCN 和 PI 为 Sigma 产品;TUNEL 试剂盒为 Trevigen 产品; caspase-3 抗体为 Santa Cruz 产品。

**细胞培养** 牛脑微血管内皮细胞的分离和培养参照 Zhang<sup>[3]</sup>描述的方法。实验前将细胞接种于 24 孔板使其生长至融合后,缺氧模型组培养液换为含 10 mmol·L<sup>-1</sup> NaCN 及 10%胎牛血清(FBS)的无糖 DMEM 培养基,置于 CO<sub>2</sub> 孵箱 20 h 后取出进行下一步处理。对照组细胞培养液仍用正常 DMEM 培养基。Caspases 抑制剂用少量 DMSO 溶解,并用培养基稀释(DMSO 终浓度 ≤0.2%)。

**末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)** 参照 TUNEL 试剂盒说明书并略作改动。用 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 去除细胞内源性过氧化物酶后,用标记反应混和液(含生物素标记的 dUTP,其余 3 种 dNTP,CO<sup>2+</sup> 和 TdT)于 37 °C 温孵 60 min 后终止反应。再将细胞与显色系统(链酶亲和素标记的辣根过氧化物酶及底物 DAB)依次温孵,脱水、透明,树胶封片。细胞计数方法同前。

**流式细胞仪分析<sup>[4,5]</sup>** 处理后的细胞用胰蛋白酶消化,细胞悬液离心洗涤 2 次,将沉淀摇散,70%乙醇 4 °C 固定过夜。再离心后用 RNA 酶 A(100 mg·L<sup>-1</sup>)于 37 °C 孵育 45 min,100 mg·L<sup>-1</sup> PI 在 4 °C 避光染色 30 min 后,进行流式细胞仪(Beckman Coulter)检测。每个样品计数约 10 000 个细胞,测定各细胞周期的 DNA 含量,得出凋亡细胞所占的比例。

**Caspase 3 免疫细胞化学染色<sup>[6]</sup>** 细胞经处理后,用含 TritonX-100 的 PBS 漂洗细胞,与抗 caspase-3 第一抗体在 4 °C 孵育过夜。PBS 漂洗细胞后,将 cyanine 标记的二抗与细胞在室温孵育 15 min,再经 PBS 漂洗,于荧光显微镜下(激发滤片 λ=554 nm,阻断滤片 λ=570 nm)观察拍照。在培养孔边缘和中心之间的位置随机选取 4 个区域进行细胞计数并取均值,每个区域计数约 200 个细胞,每组设 4 个平行孔,计算染色阳性细胞数占总细胞数的百分比。

**数据处理** 采用 Student's t-test 方法分析实验数据。

## 结果

### 1 应用台盼蓝染色法观察 caspases 抑制剂对缺氧性 VEC 的保护作用

经 NaCN 合并无糖培养基处理后,台盼蓝染色阳性细胞数明显增加,10 mmol·L<sup>-1</sup> NaCN 处理 20 h 的阳性细胞数达 54.9%。广谱 caspases 抑制剂 Z-VAD-fmk 和选择性 caspase-3,-1 和-6 抑制剂 Z-DEVD-fmk, Z-YVAD-fmk 和 Z-VEID-fmk 均非常显著地减少台盼蓝染色阳性细胞的数目(表 1)。4 个 caspases 抑制剂的有效浓度是参照文献<sup>[7,8]</sup>和预试验结果确定的(0.04 mmol·L<sup>-1</sup> Z-VAD-fmk 和 Z-DEVD-fmk 对缺氧性细胞损伤无显著性保护作用)。

**Table 1 Effect of caspase inhibitors on trypan blue positive cells induced by hypoxia ( $\bar{x} \pm s$ )**

Group (mmol·L <sup>-1</sup> )	Trypan blue positive cells/ %
Control	4.0 ± 1.8
NaCN (10)	55 ± 16 <sup>###</sup>
NaCN (10) + Z-VAD-fmk (0.1)	7 ± 3 <sup>***</sup>
NaCN (10) + Z-DEVD-fmk (0.1)	2.5 ± 0.7 <sup>***</sup>
NaCN (10) + Z-YVAD-fmk (0.04)	4.7 ± 1.7 <sup>***</sup>
NaCN (10) + Z-VEID-fmk (0.04)	6.3 ± 2.3 <sup>***</sup>

<sup>###</sup> P < 0.001 vs control; <sup>\*\*\*</sup> P < 0.001 vs NaCN group

### 2 应用 TUNEL 染色法观察 caspases 抑制剂对缺氧性 VEC 的保护作用

由于 DNA 断裂,凋亡细胞中产生很多 3'-OH 末端,在末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)的作用下,可以将标记的 dUTP 转移到 3'-OH 末端,再通过显色系统显示出来。本实验所用的试剂盒应用了生物素标记的 dUTP,显色系统为链酶亲和素标记的辣根过氧化物酶,显色底物为 DAB。正常对照组细胞经反应后不被显色,缺氧处理使部分细胞核呈棕色或棕褐色着染,形态不规整,大小不一致,属明显的凋亡特征。Z-VAD-fmk 和选择性 caspase-3,-1 和-6 抑制剂 Z-DEVD-fmk, Z-YVAD-fmk 和 Z-VEID-fmk 均使 TUNEL 阳性细胞数明显下降,具有显著性差异(表 2)。

### 3 流式细胞仪分析 caspases 抑制剂对缺氧性 VEC 的保护作用

经流式细胞仪分析细胞周期各期 DNA 含量,正常对照组细胞 DNA 多处于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期,而缺氧处理的细胞 DNA 在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期前出现了明显的“亚二倍体峰”,是凋亡细胞的标志性峰型,又称“凋亡峰”。给予 Z-VAD-fmk 和选择性 caspase-3,-1 和-6 抑制剂 Z-DEVD-fmk, Z-YVAD-fmk 和 Z-VEID-fmk 后“凋亡峰”面积均明显减小,说明细胞 DNA 断裂明显减轻(表 3)。

**Table 2** Effect of caspase inhibitors on TUNEL positive cells induced by hypoxia ( $\bar{x} \pm s$ )

Group (mmol·L <sup>-1</sup> )	TUNEL positive cells/ %
Control	3.2 ± 0.7
NaCN (10)	52 ± 7 <sup>###</sup>
NaCN (10) + Z-VAD-fmk (0.1)	25 ± 3 <sup>***</sup>
NaCN (10) + Z-DEVD-fmk (0.1)	28.8 ± 1.8 <sup>***</sup>
NaCN (10) + Z-YVAD-fmk (0.04)	10 ± 3 <sup>***</sup>
NaCN (10) + Z-VEID-fmk (0.04)	8 ± 4 <sup>***</sup>

<sup>###</sup>  $P < 0.001$  vs DMSO control; <sup>\*\*\*</sup>  $P < 0.001$  vs NaCN group

**Table 3** Effect of caspase inhibitors on area of "apoptotic peak" induced by hypoxia ( $\bar{x} \pm s$ )

Group (mmol·L <sup>-1</sup> )	Area of "apoptotic peak"/ %
Control	2.1 ± 1.2
NaCN (10)	52 ± 5 <sup>##</sup>
NaCN (10) + Z-VAD-fmk (0.1)	32 ± 4 <sup>*</sup>
NaCN (10) + Z-DEVD-fmk (0.1)	28 ± 6 <sup>*</sup>
NaCN (10) + Z-YVAD-fmk (0.04)	26 ± 8 <sup>*</sup>
NaCN (10) + Z-VEID-fmk (0.04)	10.1 ± 0.5 <sup>**</sup>

<sup>##</sup>  $P < 0.01$  vs control; <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ , <sup>\*</sup>  $P < 0.05$  vs NaCN group

#### 4 Z-YVAD-fmk 和 Z-VEID-fmk 对 caspase-3 表达的影响

血管内皮细胞经缺氧处理后 caspase-3 的表达明显升高。在荧光显微镜下正常对照组细胞呈微弱的暗红色,模型组有很多阳性细胞出现,呈明亮的红色,形态变圆。与模型对照组比较,选择性 caspase-1 抑制剂 Z-YVAD-fmk 或 caspase-6 抑制剂 Z-VEID-fmk 使呈亮红色强荧光的 caspase-3 高表达阳性细胞明显减少,阳性细胞下降率达 85.8% 和 88.5%(表 4)。

**Table 4** Effect of Z-YVAD and Z-VEID on expression of caspase-3 induced by hypoxia ( $\bar{x} \pm s$ )

Group (mmol·L <sup>-1</sup> )	Caspase-3 expression positive cell/ %
Control	2.3 ± 0.8
NaCN (10)	37 ± 8 <sup>###</sup>
NaCN (10) + Z-YVAD-fmk (0.04)	5.3 ± 1.2 <sup>***</sup>
NaCN (10) + Z-VEID-fmk (0.04)	4.3 ± 1.6 <sup>***</sup>

<sup>###</sup>  $P < 0.001$  vs control; <sup>\*\*\*</sup>  $P < 0.001$  vs NaCN group

## 讨论

心、肝、脑、肾等重要器官的缺血缺氧都可导致血管内皮细胞凋亡,细胞凋亡是一个缓慢可逆的过程。因此,研究缺血缺氧条件下血管内皮细胞凋亡的机制,对寻找能有效阻断凋亡从而保护血管内皮细胞的药物具有重要的指导意义。

本实验室采用氰化钠合并无糖培养基造成血管内皮细胞缺氧模型,发现细胞死亡具有浓度和时间依赖性。经 Hoechst 染色和电镜下检测证实有大量细胞以凋亡的形式死亡<sup>[3]</sup>。

已证实 caspase 家族在介导凋亡的过程中起到重要作用。不同的细胞类型或不同的刺激活化不同的凋亡信号转导路径,发生凋亡的机制不尽相同。其中,caspase-3 往往是一个关键的效应蛋白酶<sup>[9,10]</sup>。多种刺激最终都会使其活化,活化后可裂解多种功能蛋白质引发细胞凋亡<sup>[11]</sup>。本实验结果显示广谱 caspase 抑制剂 Z-VAD-fmk 可明显减少氰化钠诱导的牛脑微血管内皮细胞损伤,受损的细胞内 caspase-3 的表达明显升高,caspase 抑制剂有效抑制 caspase-3 的高表达,表明 caspase 家族参与了血管内皮细胞凋亡过程。

Lin 等<sup>[12]</sup>认为脑血管内皮细胞的缺氧性凋亡中有 NO 的参与,至少通过 caspase-1 和-3 发挥作用。Caspase-1 诱导凋亡的机制尚不明确,有可能以神经酰胺作为第二信使介导凋亡<sup>[14]</sup>,神经酰胺介导细胞凋亡时需要 caspase-3 的激活,神经酰胺作用位点在 caspase-3 的上游<sup>[15]</sup>。Caspase-6 与 caspase-3 均被归类为效应子 caspase,它们之间的关系亦有研究。Allsopp 等<sup>[16]</sup>发现,在去除营养导致小脑颗粒细胞凋亡的过程中,caspase-3 由位于上游的 caspase-6 激活,二者共同介导凋亡。资料<sup>[11]</sup>显示 caspase-6 与 caspase-3 共同介导剥脱诱导的正常肠上皮细胞的凋亡。本实验结果显示选择性 caspase-1 抑制剂 Z-YVAD-fmk 和 caspase-6 抑制剂 Z-VEID-fmk 均对缺氧性血管内皮细胞 caspase-3 的大量表达有明显的抑制作用,同时显著减少细胞死亡数,证明 caspase-1,-3 和-6 都参与了缺氧性血管内皮细胞凋亡,还证明在 Caspases 级联切割反应中,caspase-1 和-6 位于 caspase-3 的上游,与相关资料相符。

总之,通过本研究进一步明确了 caspases 在缺氧性脑血管内皮细胞凋亡中的作用机制,为寻找适当的治疗靶点提供了理论参考。

## References:

- [1] Wencker D, Chandra M. Rescue of dilate cardiomyopathy by caspase inhibition in FKBP-caspase-8 transgenic mice [J]. *Circulation*, 2000, **102**(18):28.
- [2] Hayakawa Y, Robert CA, Gerald WD, et al. Caspase inhibition reduces cardiac myocyte apoptosis and preserves myocardial mass during peripartum cardiomyopathy in Gαq transgenic mice [J]. *Circulation*, 2000, **102**(18):1171.

- [ 3 ] Zhang J, Tan Z, Tran ND. Chemical hypoxia-ischemia induces apoptosis in cerebromicrovascular endothelial cells [ J ]. *Brain Res*, 2000, **877**(2) :134 - 140 .
- [ 4 ] Jiang B. *Basis and Clinic of Cell Apoptosis*(细胞凋亡基础与临床) [ M ]. Beijing: People's Military Medical Press, 1999. 104 - 113 .
- [ 5 ] Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry [ J ]. *Cytometry*, 1992, **13**(8) :795 - 808 .
- [ 6 ] Shi RL, Zhang JJ. Protective effect of puerarin on vascular endothelial cell apoptosis induced by chemical hypoxia *in vitro* [ J ]. *Acta Pharm Sin* (药 学 学 报), 2003, **38**(2) :103 - 107 .
- [ 7 ] Shou Y, Gunasekar PG, Borowitz JL, *et al.* Cyanide-induced apoptosis involves oxidative-stress-activated NF-kappaB in cortical neurons [ J ]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, **164**(2) :196 - 205 .
- [ 8 ] Meguro T, Chen B, Parent AD, *et al.* Caspase inhibitors attenuate oxyhemoglobin-induced apoptosis in endothelial cells [ J ]. *Stroke*, 2001, **32**(2) :561 - 566 .
- [ 9 ] Puka-Sundvall M, Wallin C, Gilland E, *et al.* Impairment of mitochondrial respiration after cerebral hypoxia-ischemia in immature rats: relationship to activation of caspase-3 and neuronal injury [ J ]. *Brain Res Dev Brain Res*, 2000, **125**(1 - 2) :43 - 50 .
- [ 10 ] Kang PM, Haunstetter A, Aoki H, *et al.* Morphological and molecular characterization of adult cardiomyocyte apoptosis during hypoxia and reoxygenation [ J ]. *Gen Res*, 2000, **87**(2) :118 - 125 .
- [ 11 ] Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis [ J ]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(10) :7320 - 7326 .
- [ 12 ] Lin SH, Maiese K. The metabotropic glutamate receptor system protects against ischemic free radical programmed cell death in rat brain endothelial cells [ J ]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, **21**(3) :262 - 275 .
- [ 13 ] Grossmann J, Mohr S, Lapentina EG, *et al.* Sequential and rapid activation of select caspases during apoptosis of normal intestinal epithelial cells [ J ]. *Am J Physiol*, 1998, **274**(6 Pt 1) :G1117 - 1124 .
- [ 14 ] Schneider C, Delorme N, El Btaouri H, *et al.* Interleukin 1 beta (IL-1 beta) action in porhypoxia thyroid cells involves the ceramide signalling pathway [ J ]. *Cytokine*, 2001, **13**(3) :174 - 178 .
- [ 15 ] Yoshimura S, Banno Y, Nakashima S, *et al.* Ceramide formation leads to caspase-3 activation during hypoxic PC12 cell death [ J ]. *J Biol Chem*, 1998, **273**(12) :6921 - 6927 .
- [ 16 ] Allsopp TE, McLuckie J, Kerr LE, *et al.* Caspase 6 activity initiates caspase 3 activation in cerebellar granule cell apoptosis [ J ]. *Cell Death Differ*, 2000, **7**(10) :984 - 993 .