

[文章编号] 1000-4718(2017)06-1125-05

• 短篇论著 •

DAPT 在 ox-LDL 损伤 HUVECs 过程中的 细胞保护作用*

任开新, 樊子旭, 游如春, 韩蔚珉, 张然, 黄锐, 闫国良[△], 张业[△]
(厦门大学医学院, 福建 厦门 361102)

[摘要] 目的: 探究 γ -分泌酶抑制剂 *N*-[*N*-(3,5-二氟苯乙酰基)-L-丙氨酸]-S-苯基甘氨酸 t-丁酯 (DAPT) 在氧化低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 损伤人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 模型中的细胞保护作用及其对 Notch 信号通路的调控。方法: 体外培养 HUVECs, 用 ox-LDL 处理 HUVECs 构建细胞损伤模型。实验分为对照组、ox-LDL 处理组、DAPT 处理组和 DAPT + ox-LDL 处理组。用倒置相差显微镜观察不同处理方法下细胞的形态变化; CCK-8 法检测细胞存活率; Western blot 法检测蛋白 Notch1、Notch4 和 Jagged1 的表达情况。结果: 体外培养 HUVECs, 倒置相差显微镜下发现 ox-LDL 处理组细胞死亡和碎片增多, 经 DAPT 预处理后 ox-LDL 作用造成的细胞损伤死亡较少, 细胞碎片较少。通过 CCK-8 法检测发现 ox-LDL 处理组细胞存活率降低, DAPT 处理组细胞存活率升高, DAPT 预处理后 ox-LDL 造成存活率降低的幅度变小。在 ox-LDL 作用下, Notch1 和 Jagged1 蛋白表达量降低, Notch4 表达量升高; 而 DAPT 作用下 Notch1 和 Jagged1 表达量升高, Notch4 表达量降低; ox-LDL 与 DAPT 共同作用时蛋白接近正常水平。结论: ox-LDL 对 HUVECs 具有损伤作用; DAPT 减轻 ox-LDL 对 HUVECs 造成的损伤; DAPT 保护 HUVECs 免受 ox-LDL 损伤的作用与 Notch 信号通路有关。

[关键词] 人脐静脉内皮细胞; 氧化低密度脂蛋白; DAPT; Notch 信号通路

[中图分类号] R363.2⁺1

[文献标志码] A

doi: 10.3969/j.issn.1000-4718.2017.06.027

DAPT attenuates ox-LDL-induced human umbilical vein endothelial cell injury

REN Kai-xin, FAN Zi-xu, YOU Ru-chun, HAN Wei-min, ZHANG Ran, HUANG Rui, YAN Guo-liang, ZHANG Ye

(Medical College of Xiamen University, Xiamen 361102, China. E-mail: zhangye@xmu.edu.cn; 79720905@qq.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effect of *N*-[*N*-(3,5-difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT) on the Notch signaling pathway in a model of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL)-induced human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) damage. **METHODS:** HUVECs were divided into control group, ox-LDL group, DAPT group and ox-LDL + DAPT group. The morphological changes of the HUVECs with different treatments were observed under light microscope. The viability of the HUVECs was measured by CCK-8 assay. The protein expression levels of Notch1, Notch4 and Jagged1 were determined by Western blot. **RESULTS:** ox-LDL induced great damage to the HUVECs, evidenced by increased cell death and debris in the culture. However, the cell damage was abolished by adding DAPT into the culture. The viability of the HUVECs was increased by co-treatment with DAPT and ox-LDL. ox-LDL treatment significantly decreased the protein expression levels of Notch1 and Jagged1, and elevated Notch4. However, these changes were totally reversed by DAPT. None of these proteins showed significant change in the HUVECs co-treated with DAPT and ox-LDL as compared with control group. **CONCLUSION:** ox-LDL is able to induce HUVEC damage *in vitro*. DAPT attenuates ox-LDL-induced damage in the HUVECs by regulating the Notch signaling pathway.

[KEY WORDS] HUVECs; Oxidized low-density lipoprotein; DAPT; Notch signaling pathway

[收稿日期] 2016-10-17 [修回日期] 2017-03-30

* [基金项目] 厦门大学校长基金本科生项目 (No. CXB2014010)

[△]通讯作者 张业 Tel: 0592-2188670; E-mail: zhangye@xmu.edu.cn; 闫国良 Tel: 0592-2187157; E-mail: 79720905@qq.com

血管内皮细胞是血管壁的主要屏障,当血管内皮细胞损伤时,会导致泡沫细胞形成,从而诱发动脉粥样硬化的发生发展。此外,当血管内皮细胞的屏障作用缺失时,会引发血小板聚集、凝血,促进血栓性疾病的发生^[1-2]。目前许多研究发现氧化低密度脂蛋白(oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL)可以造成血管内皮细胞损伤,是动脉粥样硬化等许多心血管疾病发生发展的一个重要因素^[3]。有研究表明 ox-LDL 可以激活 Notch 信号通路促进巨噬细胞激活引起炎症反应^[4],我们由此推测两者在血管内皮细胞中也有一定的关联。既往关于 Notch 信号通路在血管中的研究主要集中于新生血管发育与成熟的过程,但是缺乏在 ox-LDL 损伤血管内皮细胞过程中是否具有保护作用的相关研究。同时, γ -分泌酶抑制剂 *N*-[*N*-(3,5-difluorophenyl)acetyl]-L-alanyl-L-serine t-butyl ester (DAPT) 可以抑制 Notch 信号通路上的相关位点^[5]。因此我们推测 ox-LDL 损伤血管内皮细胞时可能与 Notch 信号通路有关联,并且 DAPT 对血管内皮细胞可能具有一定的保护作用。本研究以体外培养人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)为研究模型,研究 DAPT 在 ox-LDL 损伤 HUVECs 过程中是否具有细胞保护作用,以及 DAPT 对 Notch 信号通路的调控情况。

材 料 和 方 法

1 材料

人脐静脉内皮细胞株(ATCC)由厦门大学医学院器官移植研究所李成林博士惠赠。

2 主要试剂

培养基 DMEM/F12 购自 HyClone; 人表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF) 购自 PeproTech; anti-Notch1 抗体、anti-Notch4 抗体和 anti-Jagged1 抗体均购自 Abcam; 氧化低密度脂蛋白购自广州奕源生物公司; DAPT 购自 Sigma; Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 购自 Dojindo。

3 主要方法

3.1 HUVECs 体外培养 HUVECs 培养在 DMEM/F12 培养基中,其中含 7% 的优质胎牛血清和 EGF 5 μ g/L,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中。待细胞铺满培养皿时传代,吸去培养液,用 PBS 轻柔洗 2 次,胰酶消化 2~3 min,待细胞脱落后,加入适量培养基终止胰酶的消化作用,收集细胞于离心管中,离心 1 000 r/min,3 min,弃上清,用新的培养基 1 mL 重悬细胞,按 1:5 接种于新培养基中。

3.2 药物处理和分组 (1) 对照组:正常培养 24 h;

(2) DAPT 处理组:待细胞贴壁后给予 25 μ mol/L DAPT 作用 24 h; (3) ox-LDL 处理组:同一批细胞贴壁后 12 h 给予 100 mg/L ox-LDL 作用 12 h; (4) DAPT + ox-LDL 处理组:待同一批细胞贴壁后先给予 25 μ mol/L DAPT 预处理 12 h,再给予 100 mg/L ox-LDL 作用 12 h。

3.3 细胞形态学观察 将贴壁长满的 HUVECs 用胰蛋白酶进行消化,细胞悬液接种于直径 2 cm 的培养皿,细胞密度 1×10^5 /L,每皿 1 mL,按以上分组给药。培养箱培养孵育后倒置相差显微镜下观察。

3.4 CCK-8 法检测细胞活力 胰酶消化 HUVECs,以每孔 8×10^3 个接种于 96 孔板。按常规培养方式复苏细胞活力 2 h,待细胞贴壁后给药,按分组给药。药物处理后用 PBS 洗去含药培养基,每孔加入新培养基 100 μ L 及 CCK-8 试剂 10 μ L 孵育 120 min。用酶标仪测定各孔在 450 nm 处的吸光度(A)值,各组的 A 值取均数用于计算细胞存活率。计算公式:细胞存活率(%) = (药物处理组 A 值 - 空白组 A 值) / (无药物处理组 A 值 - 空白组 A 值) $\times 100\%$ 。

3.5 Western blot 检测相关蛋白变化 取 HUVECs 1×10^8 /L 接种于 10 cm 培养皿,按分组给药。培养后用 RIPA 裂解液,含 1 \times cocktail 裂解细胞,并用细胞刮子充分刮下贴壁细胞,收集后摇床上冰水浴摇晃 45 min,12 000 $\times g$ 、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min 取上清。取蛋白样品 5 μ L,用 BCA 试剂盒测定样品浓度。余下部分加入 loading buffer 煮沸 5 min, -20 $^{\circ}$ C 冻存,留待上样。各个蛋白样品取 30 μ g 上样,10% SDS-PAGE 湿转至硝酸纤维素膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h, TBST 洗膜 6 min \times 3 次。室温孵育 I 抗(Notch1 1:2 000, Notch4 1:1 000, Jagged1 1:1 000) 1 h, TBST 洗膜 6 min \times 3 次。加入辣根过氧化物酶标记的兔抗人 IgG(Notch1 1:2 000, Notch4 1:250, Jagged1 1:1 000) 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 6 min \times 3 次。加入现配制的 ECL 显色液,避光 2 min,贴膜曝光。以 β -actin 蛋白作为内参照,用 ImageJ 灰度分析后进行统计学处理。

4 统计学处理

用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。数据均采用均数 \pm 标准差(mean \pm SD) 表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用 SNK- q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 药物对细胞形态学的影响

对照组的脐静脉内皮细胞的细胞胞浆丰富,胞

核大,细胞间连接紧密,边界清楚,呈单层铺路石状排列,细胞呈多角形、梭形或卵圆形。ox-LDL处理组细胞分解死亡,细胞碎片增多。DAPT处理组和对照

组无明显区别,细胞排列紧密整齐。经过DAPT预处理12h后再给ox-LDL作用12h组,细胞较ox-LDL组死亡较少,碎片较少,见图1。

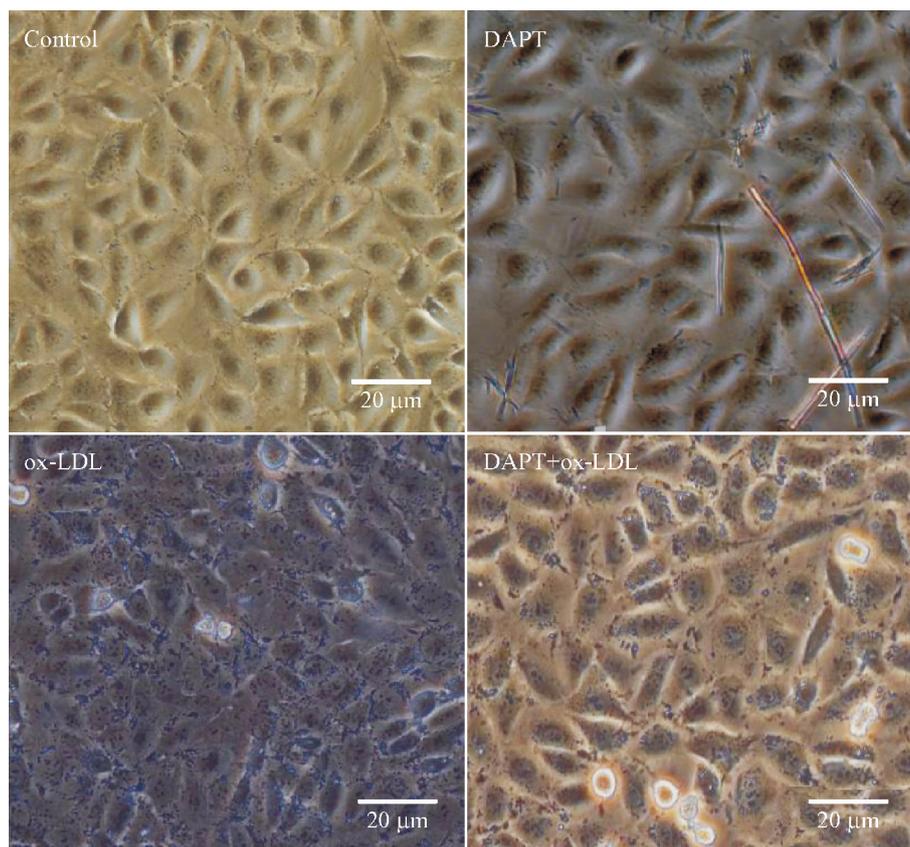


Figure 1. The light-microscopic images of HUVECs 24 h after treatment (×200).

图1 药物对细胞形态影响

2 CCK-8 法检测细胞存活率

CCK-8 法检测细胞存活率结果显示,与对照组相比,ox-LDL组细胞存活率下降,DAPT处理组细胞存活率升高,差别具有统计学显著性($P < 0.05$);经过DAPT预处理后加入ox-LDL的细胞与ox-LDL处理组相比存活率升高,差异具有统计学显著性($P < 0.05$),而与对照组相比,其差异无统计学显著性,见图2。

3 Western blot 法检测蛋白变化

Western blot 实验结果显示,Jagged1和Notch1在DAPT影响下表达降低,在ox-LDL影响下表达增加,与对照组相比差异具有统计学显著性($P < 0.05$),而经过DAPT预处理后,ox-LDL对Jagged1和Notch1表达的影响变小,与对照组相比,差异无统计学显著性;相反地,蛋白Notch4在DAPT影响下表达升高,在ox-LDL影响下表达降低,与对照组相比差异具有统计学显著性($P < 0.05$),而经过DAPT预处理后,ox-LDL对Notch4表达的影响变小,与对照组

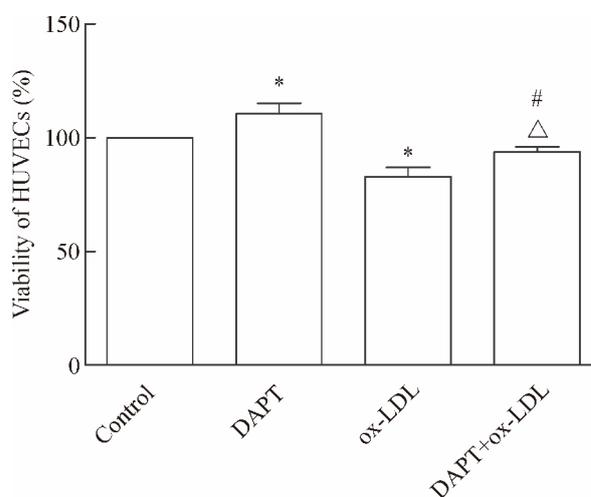


Figure 2. The viability of the HUVECs treated with DAPT, ox-LDL and in combination. Mean ± SD. $n = 4$. * $P < 0.05$ vs control group; Δ $P < 0.05$ vs DAPT group; # $P < 0.05$ vs ox-LDL group.

图2 DAPT干预条件下ox-LDL对HUVECs存活率的影响,与对照组相比,差异无统计学显著性,见图3。

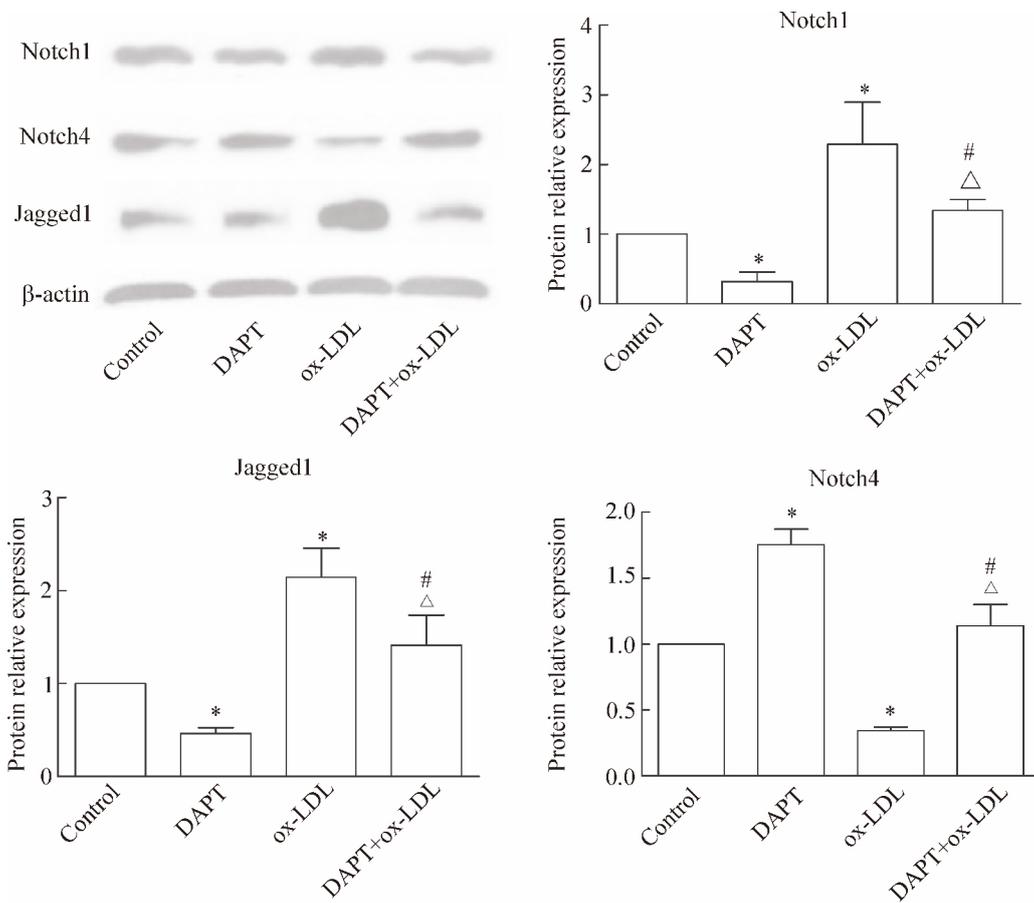


Figure 3. The changes of protein expression of Notch1 , Notch4 and Jagged1. Mean ± SD. n = 4. * P < 0.05 vs control group; Δ P < 0.05 vs DAPT group; # P < 0.05 vs ox-LDL group.

图3 药物对蛋白表达的影响

讨论

内皮细胞功能障碍是许多心血管疾病的始动环节,如动脉粥样硬化,血栓形成等,而已有的研究表明 ox-LDL 是诱导血管内皮功能受损的重要因素。因此研究 ox-LDL 对血管内皮细胞损伤的机制以及寻找保护血管内皮细胞免受 ox-LDL 损伤具有重要意义。

我们以不同浓度的 ox-LDL 处理 HUVECs,发现随着浓度增加,ox-LDL 对细胞的损伤程度逐渐加大,与相关研究结果一致^[6]。对于 ox-LDL 损伤血管内皮细胞的机制,以往研究发现其通过与细胞上的凝集素样氧化性低密度脂蛋白受体-1 结合而使血管内皮细胞损伤^[7-8]。其中,ox-LDL 可以通过细胞内信号转导激活 NF-κB,降低内皮型一氧化氮合酶活性,减少一氧化氮生成,同时增加乳酸脱氢酶和白细胞介素-8 的释放和环氧酶-2 的表达,引起内皮细胞功能障碍^[9-10]。但是目前国内外缺乏关于 ox-LDL 对血管内皮细胞损伤过程中 Notch 信号通路影响的研究。

Notch 信号通路广泛存在几乎所有细胞,调控着不同细胞的增殖、分化和凋亡,对不同的器官组织发

挥不同效应^[11-12]。Notch 信号通路在相邻细胞之间通过配体与受体相结合而影响细胞的增殖、分化和凋亡,人源细胞中配体包括 Delta 样配体 (Dll1、3、4) 与 Jagged (Jagged1、2),受体包括 Notch1 ~ 4^[13]。近来研究表明,Notch 信号通路和动脉粥样硬化等心血管疾病的发生发展也有密切关系^[14]。同时也有研究表明在 ox-LDL 刺激巨噬细胞过程中,Notch 信号通路受体 Notch1 升高,可以增加 NF-κB 的活性,从而损伤巨噬细胞^[15]。因此我们推断在血管内皮细胞损伤过程中,ox-LDL 与 Notch 信号通路存在相关联系,而 Notch 信号通路抑制剂 DAPT 可以保护 HUVECs 免受 ox-LDL 损伤。

我们通过实验,发现 DAPT 可以减少 ox-LDL 造成血管内皮细胞损伤形成的细胞碎片,通过 CCK-8 法检测细胞存活率发现 DAPT 能提高 ox-LDL 作用下 HUVECs 的存活率,由此验证了我们之前的推断,即在 ox-LDL 损伤 HUVECs 的模型中,DAPT 可以起到保护细胞,减少细胞损伤的作用。

DAPT 通过抑制 γ-分泌酶使 Notch 受体胞内段 (Notch intracellular domain, NICD) 水解和释放,导致游离 NICD 减少, NICD 对下游通路的激活减少,从而

发挥效应^[16]。在我们研究中,通过对蛋白 Notch1、Notch4 和 Jagged1 的检测发现,在 ox-LDL 与 DAPT 各自影响下,蛋白表达量增减完全相反,因此说明 ox-LDL 与 DAPT 在血管内皮细胞的 Notch 信号通路上影响是完全相反的。据 Pedrosa 等^[17]研究表明, Jagged1 对于平衡体内血管内皮的生长和成熟具有重要作用,在伤口愈合过程中, Dll4/Notch1 信号途径会抑制血管内皮的覆盖和血管生长,但这个过程又会激活 Jagged1, Jagged1 却可以通过 Jagged1/Notch4 信号途径抵消这种作用,促进内皮细胞成熟后血管生长,从而促进伤口愈合。结合我们实验结果,我们认为 ox-LDL 可能通过 Dll4/Notch1 信号途径使 HUVECs 损伤,同时会抑制具有平衡作用的 Jagged1/Notch4 信号途径,进一步加重细胞损伤,由于受体 Notch4 表达被抑制,使得相应配体 Jagged1 反馈性升高。同理, DAPT 可以抑制 Dll4/Notch1 信号途径,减少细胞损伤,通过激活 Jagged1/Notch4 信号途径而使 HUVECs 增殖成熟,使损伤血管壁再内皮化。因此 DAPT 可以拮抗 ox-LDL 对血管内皮细胞的损伤,同时保护血管内皮细胞再生和成熟,对保护血管壁的完整性有重要意义。

对于 Notch 信号通路,仍存在许多机制尚未明确,可能在 ox-LDL 影响下,Notch 信号通路的其它蛋白亦会发生不同改变。由于还存在不依赖 γ -分泌酶水解过程的非经典 Notch 信号通路, DAPT 不能完全阻断 Notch 信号通路下游靶基因的表达,其它的配体受体通路发挥的作用有待进一步研究^[18]。

总之,通过我们的研究可以得出以下结论: ox-LDL 可以通过激活 Notch 信号通路使血管内皮细胞损伤, DAPT 对血管内皮细胞具有保护作用, DAPT 通过调控 Notch 信号通路拮抗 ox-LDL 对 HUVECs 造成的损伤。

(致谢:感谢厦门大学医学院大学生创新实验室;感谢厦门大学医学院机能学实验平台;感谢厦门大学医学院器官移植研究所李成林博士;感谢厦门大学公共卫生学院黄桢翔老师。)

参 考 文 献

- [1] Park C, Kim TM, Malik AB. Transcriptional regulation of endothelial cell and vascular development [J]. *Circ Res*, 2013, 112(10): 1380-1400.
- [2] Goettsch C, Rauner M, Sinning K, et al. The osteoclast-associated receptor (OSCAR) is a novel receptor regulated by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(12): 4915-4926.
- [3] 李丹,李玉洁,杨庆,等. 血管内皮功能障碍与动脉粥样硬化研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(8): 272-276.
- [4] 付文波,李斌,龚志刚,等. 氧化低密度脂蛋白致损人单核细胞白血病细胞株源性巨噬细胞 Notch 信号的表达 [J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2013, 27(5): 427-430.
- [5] 唐凯玲,龙鼎新. Notch 信号通路在相关疾病中的研究进展 [J]. *中南医学科学杂志*, 2016, 44(2): 219-223.
- [6] 秦英,杨君,朱陵群,等. 氧化低密度脂蛋白对血管内皮细胞 ECV-304 促增殖及诱导凋亡的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19(3): 334-339.
- [7] Mattaliano MD, Huard C, Cao W, et al. LOX-1-dependent transcriptional regulation in response to oxidized LDL treatment of human aortic endothelial cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 296(6): C1329-C1337.
- [8] 朱惠莲,夏敏,唐志红,等. Ox-LDL 通过 LOX-1 双重调节血管内皮细胞炎症分子的表达 [J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(8): 1464-1469.
- [9] Bao MH, Zhang YW, Lou XY, et al. Puerarin protects endothelial cells from oxidized low density lipoprotein induced injuries via the suppression of LOX-1 and induction of eNOS [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2014, 92(4): 299-306.
- [10] Zhang J, Zhou HJ, Ji W, et al. AIP1-mediated stress signaling in atherosclerosis and arteriosclerosis [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2015, 17(5): 503.
- [11] Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development [J]. *Science*, 1999, 284(5415): 770-776.
- [12] 娄远蕾,刘芬,高法梁,等. miR-210 对血管内皮细胞 VEGF-Notch 信号通路的调控 [J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(5): 923-927.
- [13] Kopan R, Ilagan MX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism [J]. *Cell*, 2009, 137(2): 216-233.
- [14] 崔梅花,关立克. Notch 信号通路动脉粥样硬化的研究进展 [J]. *吉林医学*, 2015, 36(1): 107-109.
- [15] Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(12): 958-969.
- [16] Mori M, Miyamoto T, Yakushiji H, et al. Effects of N-[N-(3,5-difluorophenacetyl-L-alanyl)]-S-phenylglycine t-butyl ester (DAPT) on cell proliferation and apoptosis in Ishikawa endometrial cancer cells [J]. *Hum Cell*, 2012, 25(1): 9-15.
- [17] Pedrosa AR, Trindade A, Fernandes AC, et al. Endothelial Jagged1 antagonizes Dll4 regulation of endothelial branching and promotes vascular maturation downstream of Dll4/Notch1 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(5): 1134-1146.
- [18] Heitzler P. Biodiversity and noncanonical Notch signaling [J]. *Curr Top Dev Biol*, 2010, 92: 457-481.

(责任编辑:林白霜,罗森)