



缺氧预处理对人脐静脉血管内皮细胞缺氧损伤的影响

李娜¹, 吴世政², 吉维忠¹, 吴芬香¹

摘要: 目的 评价缺氧预处理(HPC)对在缺氧状态下人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)细胞水平(细胞形态学变化、细胞活力、细胞凋亡率)、分子水平[细胞内血管内皮生长因子(VEGF)和血管生成素2(Ang-2)表达]及基因水平(相应 mRNA 的表达)的影响,探讨缺氧预处理对 HUVECs 缺氧损伤的保护作用机制。**方法** 常规进行人脐静脉血管内皮细胞株的培养,建立 HUVECs 缺氧模型,分为 3 组:正常对照(CON)组、缺氧(HYP)组及 HPC 组。在显微镜下观察各组细胞形态,分别采用 CCK-8 法、Hoechst 33258 荧光染色和 Western blotting 法、RT-PCR 法检测各组细胞活性、细胞凋亡率和细胞内 VEGF、Ang-2 及相应 mRNA 的表达水平。**结果** 与 CON 组相比,HYP 组细胞明显受损、细胞活性明显减低,细胞凋亡率明显增加,细胞内 VEGF、Ang-2 及相应 mRNA 水平明显升高;而 HPC 组细胞形态接近正常,细胞活性及细胞凋亡率较 CON 组减低、但较 HYP 组高,细胞内 VEGF、Ang-2 及相应 mRNA 的表达水平较 CON 组及 HYP 组明显升高。**结论** HPC 通过上调细胞内 VEGF、Ang-2 及相应 mRNA 的表达对 VEC 缺氧损伤起到保护作用。

关键词: 血管内皮生长因子; 血管生成素 2; 血管内皮细胞; 缺氧预处理; 缺氧损伤

中图分类号: R743.3

文献标识码: A

Effect of hypoxic preconditioning on hypoxic injury of human umbilical vein endothelial cells LI Na, WU Shizheng, JI Weizhong, et al. (Department of Neurology, Qinghai Provincial People's Hospital, Xining 810007, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of hypoxic preconditioning (HPC) on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) at the cellular level (cell morphology, viability, and apoptosis rate), the molecular level [the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenin-2 (Ang-2)], and the genetic level (the expression of corresponding mRNAs), and to discuss the protective mechanism of HPC against hypoxic injury of HUVECs. **Methods** HUVECs were routinely cultured to establish a hypoxia model of HUVECs, and then HUVECs were divided into normal control group (CON group), hypoxia group (HYP group), and HPC group. Cell morphology was observed for each group under a microscope, and CCK-8 assay, Hoechst33258 fluorescent staining, Western blotting, and RT-PCR were used to measure cell viability, cell apoptosis rate, and the expression levels of VEGF, Ang-2, and corresponding mRNAs in cells. **Results** Compared with the CON group, the HYP group had significant damage of cells, a significant reduction in cell viability, and significant increases in cell apoptosis rate and the levels of VEGF, Ang-2, and corresponding mRNAs in cells, while the HPC group had basically normal cell morphology, significantly lower cell viability and apoptosis rate than the CON group, and significantly higher cell viability and apoptosis rate than the HYP group, as well as significantly higher expression levels of VEGF, Ang-2, and corresponding mRNAs than the CON group and the HYP group. **Conclusion** HPC exerts a protective effect against hypoxic injury of HUVECs by upregulating the expression of VEGF, Ang-2, and corresponding mRNAs.

Key words: Vascular endothelial growth factor; Angiogenin-2; Vascular endothelial cell; Hypoxic preconditioning; Hypoxic injury

急性缺血性卒中是最常见的卒中类型,占我国新发卒中的 69.6%~72.8%,住院期间(中位住院时间 11 d)病死率为 0.5%,并发症发生率为 12.8%,病后 3 个月的病死率为 1.5%~3.2%,1 年病死率为 3.4%~6.0%^[1],因此缺血性卒中的防治备受关注。缺血性卒中的发病风险随动脉血管粥样硬化(atherosclerosis, AS)的加重而增加,而血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)功能障碍是 AS 发生的始动因素,VEC 在维持血管稳态、调节动脉血

管收缩方面发挥着重要作用,保护 VEC 正常功能对缺血性卒中的防治尤为重要^[2,3]。而血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和血管生成素 2(angiotensin-2, Ang-2)对内皮细胞活化、迁移、增殖过程中起重要作用^[4]。而缺氧预处理

收稿日期:2024-10-09;修订日期:2024-11-30

作者单位:(1. 青海省人民医院神经内科,青海 西宁 810007;2. 四川大学华西医院高原医学中心,四川 成都 610041)

通信作者:吴世政, E-mail: wushizheng2005@hotmail.com

(hypoxic preconditioning, HPC)可以促进细胞因子的生成,增强组织细胞的缺氧耐受力^[5-7],具有神经保护作用^[7,8]。本研究拟采用人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)作为研究对象,建立体外VEC缺氧模型,分别在细胞水平、分子水平及基因水平观察HPC对HUVECs缺氧损伤的影响,探讨HPC对HUVECs缺氧损伤保护机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 试剂:DEPC(罗氏公司), Tris 碱(北京鼎国), Hoechst 33258(美国Sigma), CCK-8 试剂盒(上海贝博公司 Cell Counting Kit-8), SYBRGreen(TOYOBO 公司), Rever Tre Ace-a-逆转录试剂盒, TRNzol(北京天根), VEGF、Ang-2、GAPDH 引物(生工生物上海有限公司), 蛋白 marker(美国 BIO-RAD), 多克隆兔抗 Ang-2(Abcam 公司), 单克隆鼠抗 VEGF(Abcam 公司)。仪器:CO₂培养箱、三气厌氧培养箱(美国 Thermo 公司), 全自动酶标读数仪、SDS-PAGE 蛋白电泳仪(Cat. No VE-180)、GelDoc 2000 凝胶成像分析系统、WB 专用扫描仪、Quantity One 图像分析软件(美国 BIO-RAD), PCR System (applied biosystems)等。

1.2 细胞培养 选取由重庆医科大学病理研究所提供的HUVECs细胞株。细胞株常规复苏和传代在95%空气,5% CO₂,37℃和饱和湿度的培养箱中进行。细胞黏附在培养瓶壁的表面生长,当达到80%细胞融合后,挑选增殖状况良好的细胞,进行传代。以细胞生长密度为10⁵个/ml密度传代,36~72 h后,细胞分裂加速,进入指数生长期。此时,将培养基更换为无血清DMEM培养液,并继续培养细胞24 h,使其进入静止期。

1.3 细胞缺氧模型的建立和分组 随机将细胞分为3组。(1)对照组(CON):细胞在5%CO₂、37℃的常氧培养箱中培养至实验结束。(2)缺氧组(HYP):根据参考文献^[9],细胞在厌氧培养箱(1% O₂+94% N₂+5% CO₂)中培养8 h直至实验结束。(3)HPC组:细胞在厌氧培养箱(1% O₂+94% N₂+5% CO₂)中培养2 h,然后在常氧培养箱中继续培养12 h,后同第2组操作方法,每组重复3个样本。

1.4 CCK-8法检测细胞存活率 将细胞悬液调整到5×10⁴个/孔细胞的浓度,然后接种到96孔板中,每组都有5个重复孔,同时还有一个空白孔,孔中没有加入细胞。正常培养36 h直到细胞扩散到平板底部后,换用无血清培养基继续培养12 h。实验随机分组,按每组操作要求结束后,取出96孔板,避光加入10 μl的CCK-8,在正常氧气条件下孵育1 h,测量450 nm处的吸光度(optical densit, OD),此过程重

复5次。细胞活力(%)=(处理组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照细胞 OD 值-空白组 OD 值)×100%。

1.5 Hoechst 33258 检测细胞凋亡 细胞以10⁵个的密度种植在3个24孔板中,正常培养36 h,细胞80%融合用于实验。按照各组的条件处理和固定细胞后,在避光条件下,立即使用浓度为10 μg/ml的Hoechst 33258 染色剂在37℃孵育细胞10 min,用PBS冲洗并停止染色,应用倒置荧光显微镜,观察细胞形态并拍照采集照片。在高倍放大镜下,每组随机选取10个不同的视野区域,使用US Image-Pro Plus 图像分析系统进行分析,并且计算出细胞的凋亡率。

1.6 Western blotting 法检测 VEGF、Ang-2 蛋白的表达 用25 cm²的培养瓶种植细胞,并且依各组的要求将细胞进行处理。然后提取蛋白质,使用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定样本的蛋白质浓度,Western 印迹蛋白质上样量根据蛋白质浓度确定。使用常规PCR设备,99℃,变性5 min;VEGF 和 Ang-2 蛋白表达检测通过标准聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-Polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE 或 PAGE)。蛋白表达采用ECL 化学发光成像检测,并使用Bio-Rad 凝胶成像系统捕获。使用Quantity One 软件分析条带的灰度值。直到获得满意的结果,每组样品进行3次电泳,用于重复验证结果。

1.7 RT-PCR 检测缺氧诱导基因 VEGF、Ang-2 mRNA 的表达 根据试剂盒提供的说明步骤进行RT-PCR 检测。cDNA 的制备总体积为20 μl,逆转录产物保存在-80℃。引物由上海生工生物有限公司合成,根据GenBank 中该基因的mRNA 序列设计。上下游引物序列如表1所示,反应条件:94℃-5 min→(94℃-30 s→57℃-30 s→72℃-30 s)×32 cycles→72℃-10 min。为消除每次操作误差对实验结果的影响,应用GAPDH 为内参照物,把电泳曲线中VEGF 及 Ang-2 的吸光度与内参的吸光度比值作为目的基因的相对浓度。计算相对数:相对系数=目的带表达强度/内参表达强度。

表1 引物序列

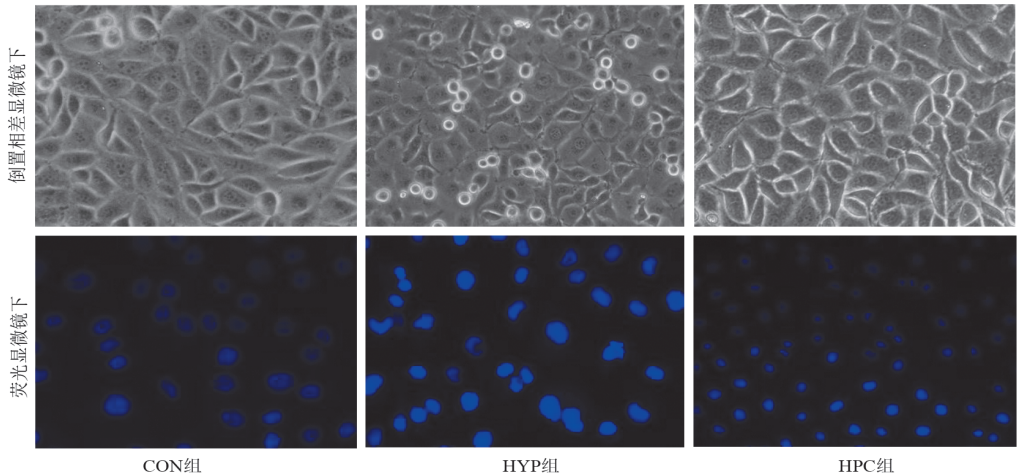
基因	上/下游	引物序列
Ang-2 (203 bp)	上游	5'-TGCACAATGCTCTCACGTTCTC-3'
	下游	5'-CAGCTCCCGTAAGTCAGATGTTG-3'
VEGF (250 bp)	上游	5'-CGCCATTTTATTTTCTTGCTGC-3'
	下游	5'-CCCCTCCCAACTCAAGTCCA-3'
GAPDH (418 bp)	上游	5'-GGGAGCCAAAAGGGTCATCATC-3'
	下游	5'-GCAGTTTTTCTAGACGGCAGGT-3'

1.8 统计学分析 使用 SPSS 20.0 软件对实验数据进行统计分析处理,并且进行方差齐性检验后,各组间比较应用单因素方差分析,用 χ^2 检验处理细胞凋亡率,实验结果以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态 倒置相差显微镜(见图 1)显示,CON 组的细胞,细胞质清晰,胞体透明,分界明

确,有少量颗粒状代谢物沉积;HYP 组的细胞,细胞皱缩,胞体较小,间距较大,细胞质有许多颗粒状沉积,细胞损伤明显;HPC 组的细胞形态基本正常。荧光显微镜(见图 1)显示,CON 组细胞核染色呈均匀蓝色,细胞形态正常;HYP 组和 HPC 组观察到细胞形态呈圆形、皱缩并与邻近细胞分离,部分细胞凋亡,细胞质凝结,可见凋亡小泡,核染色质以块状、新月形、碎裂状堆积在核膜边缘。



注:在倒置显微镜及荧光显微镜下,3组细胞形态比较,HYP组见细胞皱缩及细胞凋亡,HPC组在倒置显微镜下细胞形态接近正常组,在荧光显微镜下可见细胞皱缩,部分细胞凋亡。

图1 显微镜下细胞形态

2.2 细胞存活率及凋亡率 CCK-8法检测及Hochest 33258检测显示不同处理对HUVECs存活力及凋亡率的影响(见表2)。

表2 存活率及凋亡率					
组别	CON组	HYP组	HPC组	χ^2 值	P值
存活力(%)	100.00	53.00 ^a	77.00 ^{ab}	39.51	<0.01
凋亡率(%)	4.30	25.30 ^a	15.20 ^{ab}	99.23	<0.01

注:与CON组相比^a $P<0.05$;与HYP组相比^b $P<0.05$ 。

2.3 VEGF、Ang-2蛋白的表达 Western blotting检测显示不同处理对VEGF及Ang-2蛋白表达影响(见图2)。

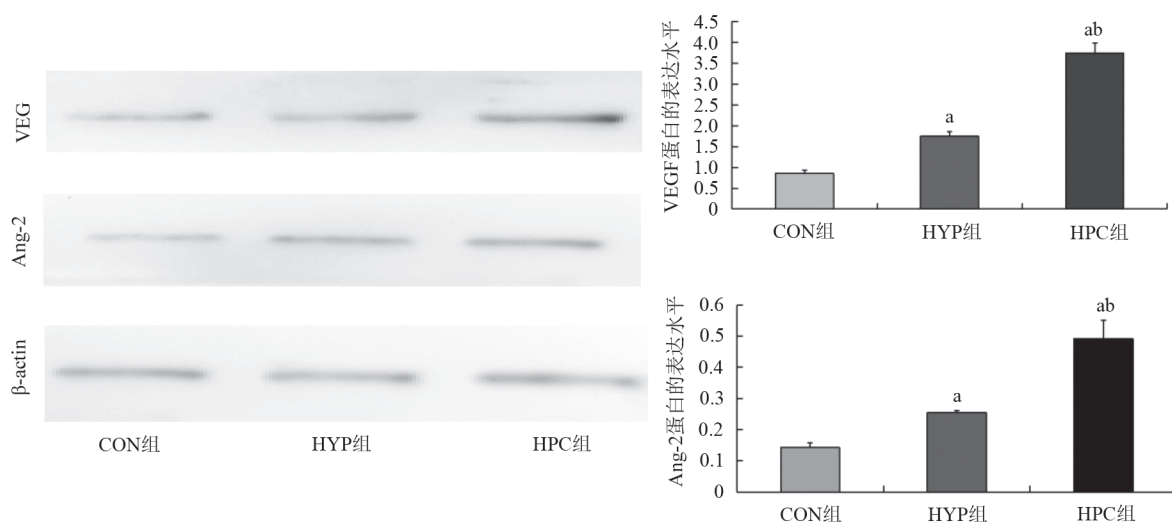
2.4 RT-PCR检测 VEGF、Ang-2 mRNA 的表达 RT-PCR检测不同处理对VEGF、Ang-2 mRNA的表达影响(见图3)。

3 讨论

本实验建立了模拟脑血管内皮细胞缺氧损伤的

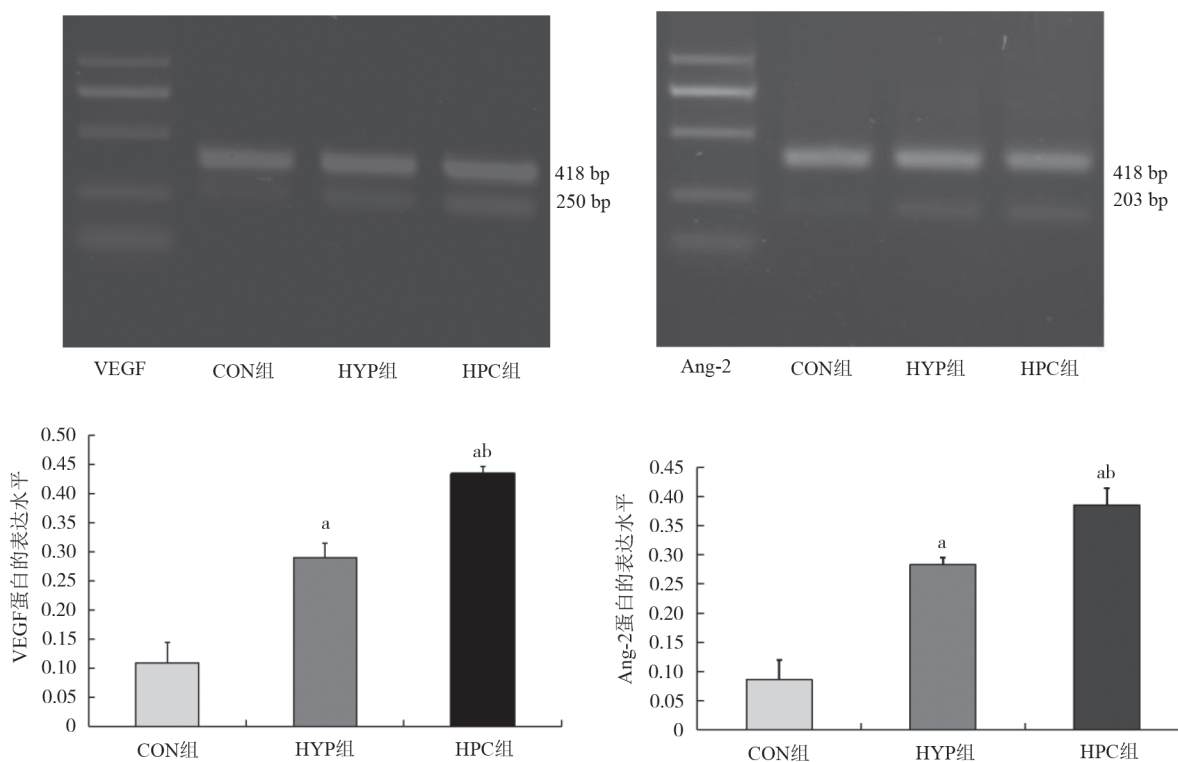
HUVECs体外培养系统,研究了缺氧预处理对HUVECs缺氧损伤的保护作用,并且研究其对Ang-2和VEGF表达的影响。缺氧预处理是机体经历反复的短暂性缺氧适应,机体自身或细胞的内源性防御机制可以被激活,使得组织和细胞防御及承受随后更加严重的缺氧或缺血损伤,这是一种强大的内源性防御机制。缺氧预处理可诱导细胞和组织发生表型和功能变化^[7,10],对多种致死性应激产生防御和抵抗,这种现象存在于多个种属动物的体外和体内的防御和抗性诱导已经证实^[11,12]。此外,还有研究认为,缺氧预处理可促进骨髓间充质干细胞生存和血管再生^[13]。

在缺氧条件下,新生血管生成迅速启动,VEC的激活是第一步反应,VEGF是目前公认的最强大的促血管生成因子,也是最主要的启动因子^[14,15]。在大脑的神经元、星形胶质细胞和小胶质细胞中均有VEGF的表达,可参与调控新生血管的再生,通过与VEC上的VEGF受体结合促进VEC增殖,增加缺氧缺血部位的毛细血管密度和通透性,促使组织发挥“自身搭桥”作用,减轻缺氧缺血引起的神经损伤^[16]。



注:与CON组相比 a P <0.05;与HYP组相比 b P <0.05。

图2 VEGF、Ang-2蛋白的表达



注:与CON组比较 a P <0.05;与HYP组比较 b P <0.01。

图3 VEGF、Ang-2 mRNA的表达

Ang贯穿于血管生成的全过程,促血管生成能力强大,Ang/Tie2信号通路是血管生成和血管完整性的重要调节剂,并在一定程度上弥补了VEGF的不足^[14,17]。张明亮等^[18]在血管瘤干细胞的研究中发现Ang-2上调可以增加VEGF等血管生成调控蛋白的表达,从而增强血管瘤干细胞的血管生成的能力。

研究也表明,VEGF可上调Ang-2表达进而促进血管增生,证实了两者的协同作用^[19,20]。实验通过建立HUVECs体外培养体系,模拟VEC缺氧损伤,应用RT-PCR法和Western blotting法检测缺氧状态下细胞内Ang-2、VEGF蛋白水平的表达。结果显示,在正常血管内皮细胞中VEGF和Ang-2蛋白呈较低水

平表达,在缺氧状态下,VEGF 和 Ang-2 蛋白水平有所增加,在缺氧预处理状态下再缺氧处理 VEGF 和 Ang-2 蛋白水平则显著增加。

综上所述,通过 HPC,使缺氧 VEC 中 VEGF、Ang-2 蛋白的表达明显上调,说明 HPC 可减轻 HUVECs 缺氧损伤,对 VEC 有保护作用。这为 HPC 成为缺血性卒中的防治措施奠定了部分理论基础。但 HPC 保护或对抗 VEC 功能障碍的具体机制及 HPC 在临床应用具体实施方案还需进一步探讨和研究。

利益冲突声明: 所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明: 李娜负责论文设计、实验操作、研究过程的实施、撰写论文;吉维忠负责数据收集、统计学分析、绘制图表;吴芬香负责文献收集、实验操作;吴世政负责拟定写作思路、指导撰写论文、修改论文并最后定稿。

[参考文献]

- [1] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性卒中诊治指南 2023[J]. 中华神经科杂志, 2024, 57(6): 523-559.
- [2] Arderiu G, Espinosa S, Peña E, et al. Tissue factor variants induce monocyte transformation and transdifferentiation into endothelial cell-like cells[J]. J Thromb Haemost, 2017, 15(8): 1689-1703.
- [3] 宋光兰, 陈俊, 鲜文. 曲美他嗪对缺氧状态下血管内皮细胞线粒体损伤的保护作用[J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(2): 148-151.
- [4] Davis S, Papadopoulos N, Aldrich TH, et al. Angiopoietins have distinct modular domains essential for receptor binding, dimerization and superclustering[J]. Nat Struct Biol, 2003, 10(1): 38-44.
- [5] Li S, Hafeez A, Noorulla F, et al. Preconditioning in neuroprotection: From hypoxia to ischemia[J]. Prog Neurobiol, 2017, 157: 79-91.
- [6] Wang D, Liu Y, Yang X, et al. Hypoxic preconditioning enhances cell hypoxia tolerance and correlated lncRNA and mRNA analysis[J]. Life Sci, 2018, 208: 46-54.
- [7] 李婧静, 吴世政, 薛孟周, 等. 经典瞬时受体电位通道 3 与缺氧预处理大鼠脑梗死的关系[J]. 郑州大学学报(医学版), 2020, 55(6): 806-810.
- [8] Huang L, Wu S, Li H, et al. Hypoxic preconditioning relieved ischemic cerebral injury by promoting immunomodulation and microglia polarization after middle cerebral artery occlusion in rats[J]. Brain Res, 2019, 1723: 146388.
- [9] Webster KA, Discher DJ, Bishopric NH. Cardioprotection in an in vitro model of hypoxic preconditioning[J]. J Mol Cell Cardiol, 1995, 27(1): 453-458.
- [10] Hu Y, Chen W, Wu L, et al. Hypoxic preconditioning improves the survival and neural effects of transplanted mesenchymal stem cells via CXCL12/CXCR4 signalling in a rat model of cerebral infarction[J]. Cell Biochem Funct, 2019, 37(7): 504-515.
- [11] 吴世政. 高原脑科学研究进展[J]. 高原医学杂志, 2019, 29(1): 47-53.
- [12] 杨鹏, 吴世政, 侯倩, 等. 缺氧预处理对缺血性脑卒中大鼠的脑保护作用及 H3R17me2 表达的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2018, 35(2): 119-122.
- [13] 侯婧瑛, 于萌蕾, 郭天柱, 等. 缺氧预处理激活 HIF-1 α /MALAT1/VEGFA 通路促进骨髓间充质干细胞生存和血管再生[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(7): 985-990.
- [14] 张璩方, 李梦华, 刘暖, 等. 黄芪丹参配伍提取物经 VEGF、Ang1/Tie2 通路对心肌梗死大鼠血管新生的病理影响[J]. 科学技术与工程, 2020, 20(1): 104-108.
- [15] 张珉. 血管内皮细胞生长抑制因子(VEGI)的结构与功能关系及作用机理研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2003.
- [16] Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in signaling and disease: beyond discovery and development[J]. Cell, 2019, 176(6): 1248-1264.
- [17] Moritz F, Schniering J, Distler JHW, et al. Tie2 as a novel key factor of microangiopathy in systemic sclerosis[J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1): 105.
- [18] 张明亮, 吴杉英, 王彪, 等. 血管生成素-2 上调增强血管瘤干细胞血管形成能力的研究[J]. 中国美容医学, 2020, 29(9): 89-91.
- [19] Zong X, Wu S, Li F, et al. Transplantation of VEGF-mediated bone marrow mesenchymal stem cells promotes functional improvement in a rat acute cerebral infarction model[J]. Brain Res, 2017, 1676: 9-18.
- [20] González-González A, González A, Alonso-González C, et al. Complementary actions of melatonin on angiogenic factors, the angiopoietin/Tie2 axis and VEGF, in co-cultures of human endothelial and breast cancer cells[J]. Oncol Rep, 2018, 39(1): 433-441.

引证本文:李娜,吴世政,吉维忠,等. 缺氧预处理对人脐静脉血管内皮细胞缺氧损伤的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2024, 41(12): 1059-1063.