

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.07.004

PKC δ 在游离脂肪酸诱导内皮细胞凋亡过程中的作用研究

杨飞燕¹, 陈曼华¹, 蔡 威^{2 Δ}

(华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院:1. 心内科;2. 普外科, 武汉 430014)

[摘要] **目的** 探讨蛋白激酶 C δ (PKC δ) 在游离脂肪酸(FFAs) 诱导内皮细胞凋亡过程中的作用。**方法** 培养人脐静脉内皮细胞, 分别给予不同浓度的 FFAs 刺激, 转染 PKC δ siRNA 以抑制 PKC δ 的表达。使用比色法检测细胞的增殖情况, 采用定量流式细胞术测定细胞凋亡情况, 免疫印迹法检测 PKC δ 蛋白及磷酸化蛋白的表达水平。**结果** 在人脐静脉内皮细胞内 FFAs 可产生多种效应, 包括浓度依赖性的抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡、增加 PKC δ 的表达和磷酸化等。抑制 PKC δ mRNA 的表达可导致 FFAs 诱导细胞凋亡减少。**结论** PKC δ 可能介导内皮细胞中 FFAs 诱导的细胞凋亡。

[关键词] PKC δ ; 游离脂肪酸; 内皮细胞; 凋亡; siRNA 抑制

[中图分类号] R587.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)07-0876-02

The investigation of the role of PKC δ in free fatty acid-induced endothelial cell apoptosis

Yang Feiyan¹, Chen Manhua¹, Cai Wei^{2 Δ}

(1. Department of Cardiology, the Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430014, China; 2. Department of Surgery, the Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430014, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of PKC δ in free fatty acid-induced endothelial cell apoptosis. **Methods** In addition, we looked for evidence of apoptosis-related PKC δ signal pathway. Human umbilical vein endothelial cells were treated with various concentrations of free fatty acids and transiently transfected with PKC δ siRNA to inhibit PKC δ expression. Cell proliferation was determined through colorimetric assays, and apoptosis was quantified using flow cytometry. Protein expression was determined from cell lysates use Western blots with antibodies against p-PKC δ Tyr512, PKC δ . Statistical analyses were performed. **Results** Free fatty acids had multiple effects on human umbilical vein endothelial cells, including concentration-dependent inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis, increased Fas expression, and increased PKC δ expression and phosphorylation. Inhibition of PKC δ mRNA expression by PKC δ siRNA led to a reduction in free fatty acid-induced apoptosis. **Conclusion** The free fatty acid-induced apoptosis in endothelial cells are possibly mediated by PKC δ .

[Key words] PKC δ ; free fatty acids; endothelial cells; apoptosis; siRNA inhibition

蛋白激酶 C δ (protein kinase C δ , PKC δ) 是新型蛋白激酶 C (new protein kinase C, nPKC) 家族成员, 广泛存在于组织细胞中。与传统型 PKC(classic protein kinase C, cPKC) 和非经典型 PKC(atypical protein kinase C, aPKC) 不同, PKC δ 能被二酰甘油(diaclyglycerol, DAG) 非 Ca²⁺ 依赖性激活。激活后的 PKC δ 是凋亡信号的重要介导者。2 型糖尿病与动脉粥样硬化和血管病变有关, 内皮细胞损伤是关键^[1]。内皮功能障碍涉及诸多改变, 包括细胞增殖、屏障作用、与其他循环细胞的黏附作用以及对凋亡信号的敏感性等^[2]。游离脂肪酸(free fatty acids, FFAs) 的上升不仅促进靶器官的损伤, 也与糖尿病的进展有关^[3]。FFAs 及高糖均可导致内皮细胞功能紊乱, 可能部分是通过 PKC α 及 PKC δ 途径来实现的。研究表明^[4-7], FFAs 可诱导内皮的功能障碍和血管内皮细胞的损伤。这些数据表明, FFAs 在糖尿病复杂的进展中扮演重要角色。然而, FFAs 诱导内皮细胞凋亡的机制目前还不甚了解。

细胞增殖和凋亡等多种细胞功能的介质均为活性 PKC δ ^[8-9]。PKC δ 的活性是诱导多种细胞凋亡, 包括嗜中性粒细胞、角质形成细胞、神经元细胞、成纤维细胞、转化细胞和心肌细胞^[10]。由于细胞类型和条件的改变, PKC δ 的具体活性是复杂的, 在某些情况下促进细胞增殖而在另外一些情况下可能促进细胞凋亡。虽然 PKC δ 与糖尿病细胞损伤相关, 但在血管内皮细胞中 FFAs 诱导凋亡的具体机制还没有阐明。本研究旨在探讨 PKC δ 在 FFAs 诱导内皮细胞凋亡过程中的重要

作用。

1 材料与方法

1.1 材料 HUVEC-CS(武汉大学生物保存中心); FFAs 及棕榈酸(Sigma 公司); 高糖 DMEM 培养基及 10% 胎牛血清(Gibco 公司); PKC δ (Abcam 公司); 抗-PKC δ siRNA; PKC δ -siRNA kit(Pierce, IL); 实时定量和逆转录试剂盒(Toyobo 公司); 转基因 3000 软件(Corbett Research, Qiagen GmbH, Hilden); PKC δ -siRNA(Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA); 细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物公司); β -肌动蛋白(Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA)。

1.2 细胞培养 来源于武汉大学生物保存中心的人类脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC-CS), 采用含高糖的 DMEM 培养基, 包含 10% 胎牛血清, 温度 37 °C, CO₂ 含量 5%。

1.3 FFAs 和 siRNAs 处理细胞 根据文献报道的描述制备 FFAs^[11]。分别在 96 孔和 12 孔板上接种 HUVEC-CSs, 500 μ L/孔。当细胞汇合达到 60%~70%, 培养于 DMEM 高糖培养基(含 2% FBS), 培养 12 h 后, 转染抗-PKC δ siRNA 细胞, 然后再次悬浮于无血清的 OPTIME, 接种到 6 孔和 12 孔板, 培养 48 h。提取 RNA, 用于反转录和实时定量 PCR(实时定量和逆转录试剂盒, Toyobo, Japan), 其结果的分析使用转基因 3000 软件。细胞培养按上述进行, 细胞同步采用高糖介质进行(含 2% FBS), 12 h。然后细胞用 2 μ g 的 PKC δ -siRNA 转染

或者不转染(阴性对照),6 h 后,最终的浓度为 50、75、100 $\mu\text{mol/L}$,加入 FFAs,孵育 48 h。收取细胞,进行流式细胞仪检测以及细胞凋亡检测。重复 3 次。

1.4 细胞生存和凋亡分析 采用比色法对经过处理的细胞进行细胞活力检测^[12]。将 HUVEC-CSs 100 μL 按照 1×10^4 cells/孔的标准接种在 96 孔板上,孵育 6 h。每孔加入 2 μL WST-1 试剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,在 490 nm 分光光度计检测。将上述实验重复 3 次。在不同条件下将细胞与 WST-1(10 μL /孔)共孵育在 96 孔板,测定吸光度。分别用 0.25%胰酶消化处理各组细胞,调整浓度至 $5 \times 10^5/\text{mL}$,孵育在含 5 μL 膜联蛋白、5 μL PI、2.5 μL TritonX-100 和 RNAse 的溶液中,10~15 min,避光,进而检测细胞凋亡。然后通过流式细胞仪分析上述细胞。重复上述实验 3 次。

1.5 蛋白免疫印迹(western blot) 经过上述处理因素处理细胞后,裂解细胞,从细胞裂解液中提取蛋白,在 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)分离。分离的蛋白质从凝胶上转移到 PDVF 膜。免疫印记使用抗体:PKC δ 、p-PKC δ Tyr512 和 β -肌动蛋白。将蛋白条的黑色带视作化学表达增强的标志,所有条带均与 β -肌动蛋白对比。重复上述实验 3 次。

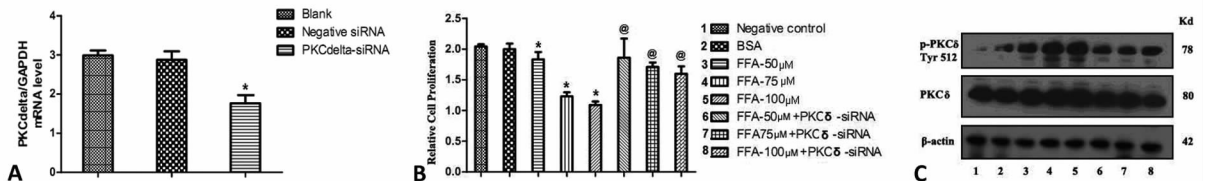
1.6 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计分析软件进行数据统

计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内比较采用方差分析,组间数据比较采用最显著差异(LSD)分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PKC δ 逆转 FFAs 抑制 HUVEC-CSs 增殖 在转染 anti-PKC δ siRNA 48 h 后,HUVEC-CSs 中的 PKC δ mRNA 表达显著下调到 60%左右。转染阴性对照 siRNA 不影响 PKC δ mRNA 的表达(图 1A)。将细胞暴露于不同浓度的 FFAs 或转染 PKC δ siRNA 后,检测细胞的增殖情况(图 1B),FFAs 处理能够以浓度依赖性的方式抑制 HUVEC-CSs 的增殖,FFAs 浓度越高,增殖率越低(图 1B);PKC δ 可逆转 FFAs 抑制 HUVEC-CSs 的增殖。表明 PKC δ 信号通路可能介导了 FFAs 诱导 HUVEC-CSs 的生长抑制效应。

2.2 PKC δ siRNA 减少 HUVEC-CSs 中磷酸化 PKC δ 表达 细胞氧化应激应答与 PKC δ 第 512 位酪氨酸的磷酸化水平有关^[13]。为了进一步研究细胞对 FFA 的应答是否也有这一机制的参与,在不同 PKC δ 浓度条件下的 Try512 磷酸化水平下,使用 50、75、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 FFAs 处理,PKC δ -Try512 发生了磷酸化,并且 PKC δ -Tyr512 磷酸化水平增加与 FFAs 呈浓度依赖性。然而,使用 PKC δ siRNA 处理 HUVEC-CSs 后可以明显减少 PKC δ 及磷酸化 PKC δ -Tyr512 的表达(图 1C)。

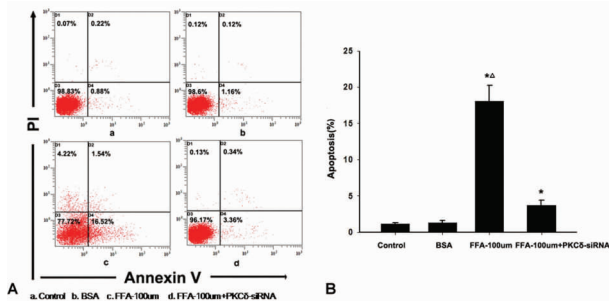


将各组培养的细胞提取总 RNA 后,检测细胞中的 PKC mRNA 含量,并采用免疫印迹同步分析。A:在转染 anti-PKC δ siRNA 48 h 后,HUVEC-CSs 中的 PKC δ mRNA 表达显著下调到 60%左右,转染阴性对照 siRNA 不影响 PKC δ mRNA 的表达。B:将细胞暴露于不同浓度的 FFAs 或转染 PKC δ siRNA 后,FFAs 处理能够以浓度依赖性的方式抑制 HUVEC-CSs 的增殖;FFAs 浓度越高,增殖率越低。C:免疫印迹检测同步分析,确定 FFAs 对 PKC Tyr512 的磷酸化和 PKC siRNA 的效应。*: $P < 0.05$,与阴性对照;@: $P < 0.05$ 与 FFAs 50 $\mu\text{mol/L}$ 、FFAs 75 $\mu\text{mol/L}$ 和 FFAs 100 $\mu\text{mol/L}$ 对照。

图 1 FFAs 介导的人脐静脉内皮细胞凋亡过程中 PKC 的检测

2.3 PKC δ siRNA 减少 HUVEC-CSs 凋亡 对 HUVEC-CSs 凋亡采用流式细胞术检测分析。使用 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 FFAs 处理 48 h 后细胞的凋亡率是未处理组细胞的 14.1 倍(图 2)。使用 PKC δ siRNA 处理细胞后,早期凋亡比例减少了 79%。

使用。所以,FFAs 可说是进行持久活动所需的物质。本实验结果显示 FFAs 对 HUVEC-CSs 有多种效应,如浓度依赖性抑制细胞增殖、诱导凋亡、增加 PKC δ 及磷酸化 PKC δ 的表达。采用 PKC δ siRNA 技术抑制 PKC δ mRNA 的表达可以降低细胞凋亡。



采用无 FFA(a)、BSA(b)、FFAs 100 $\mu\text{mol/L}$ (c)或 FFAs 100 $\mu\text{mol/L}$ 和 PKC siRNA(d)处理 HUVECs 细胞,用 Annexin 和 PI 染色。流式细胞术分析染色的细胞,确定经历凋亡的细胞百分比。

图 2 FFAs 介导的细胞凋亡过程中流式细胞术检测细胞凋亡

3 讨论

FFAs 是中性脂肪分解成的物质。当肌肉活动所需能源肝糖耗尽时,脂肪组织会分解中性脂肪成为 FFAs 来充当能源

PKC δ 在内皮细胞增殖中的作用最近由 Bai 等^[14]描述,他们发现 PKC δ 缺陷大鼠存在损伤动脉内皮化延迟现象。大量研究已证实 PKC δ 活性与糖尿病相关的病理性血管新生、视网膜外膜细胞凋亡等密切相关^[15]。大量研究证实 PKC 家族参与了代谢及心血管疾病,但不同分子之间存在很大的差异。PKC δ 在前凋亡信号通路中起着至关重要的作用。本研究结果进一步证实了 PKC δ 在高糖中内皮功能失调中的潜在作用。

早期研究报道 PKC 调控 Fas 蛋白表达,抑制 Fas 介导的 T 细胞凋亡,通过新技术区分 PKC 不同亚型进行后续研究尚无相关报道。本研究中,FFAs 处理 HUVEC-CSs A 细胞可以显著增加 PKC δ 及 Fas 的表达,同时也增加了与 PKC δ 激酶活性激活相关的磷酸化 PKC δ -Tyr512 的表达^[10]。PKC δ siRNA 处理细胞后可以抑制 FFAs 诱导的 Fas 及 PKC δ 的表达,同时也抑制了磷酸化 PKC δ -Tyr512 的表达。这表明 Fas 是 FFAs 诱导的凋亡信号通路中 PKC δ 的下游信号分子。

本研究也存在着局限性。如进一步研究(下转第 880 页)

- Biol, 2002, 80(2): 231-238.
- [2] Sithanandam G, Anderson LM. The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy [J]. *Cancer Gene Ther*, 2008, 15(7): 413-448.
- [3] Ruan SQ, Wang ZH, Wang SW, et al. Heregulin- β 1-induced GPR30 upregulation promotes the migration and invasion potential of SkBr3 breast cancer cells via ErbB2/ErbB3-MAPK/ERK pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 420(2): 385-390.
- [4] Ruan SQ, Wang SW, Wang ZH, et al. Regulation of HRG- β 1-induced proliferation, migration and invasion of MCF-7 cells by upregulation of GPR30 expression [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(1): 131-138.
- [5] Shou J, Massarweh S, Osborne CK, et al. Mechanisms of tamoxifen resistance; increased estrogen receptor-HER2/neu cross-talk in ER/HER2-positive breast cancer [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2004, 96(12): 926-935.
- [6] Prossnitz ER, Maggiolini M. Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30 [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 308 (1/2): 32-38.
- [7] Filardo EJ, Graeber CT, Quinn JA, et al. Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(21): 6359-6366.
- [8] Li Q, Ahmed S, Loeb JA. Development of an autocrine neuregulin signaling loop with malignant transformation of human breast epithelial cells [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(19): 7078-7085.
- [9] Mazumdar A, Wang RA, Mishra SK, et al. Transcriptional repression of oestrogen receptor by metastasis-associated protein 1 corepressor [J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(1): 30-37.
- [10] Frogne T, Laenkholm AV, Lyng MB, et al. Determination of HER2 phosphorylation at tyrosine 1221/1222 improves prediction of poor survival for breast cancer patients with hormone receptor-positive tumors [J]. *Breast Cancer Res*, 2009, 11(1): R11.
- [11] Eccles SA. The role of c-erbB-2/HER2/neu in breast cancer progression and metastasis [J]. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2001, 6(4): 393-406.
- [12] Lubig J, Lattrich C, Springwald A, et al. Effects of a combined treatment with GPR30 agonist G-1 and Herceptin on growth and gene expression of human breast cancer cell lines [J]. *Cancer Invest*, 2012, 30(5): 372-379.

(收稿日期: 2014-10-14 修回日期: 2014-12-17)

(上接第 877 页)

需要明确 PKC 表达水平与 PKC 磷酸化之间的联系。总之,本研究表明 PKC δ 介导内皮细胞增殖、凋亡,其可能与下游 Fas 等其他信号相关。

参考文献

- [1] Piro S, Spampinato D, Spadaro L, et al. Direct apoptotic effects of free fatty acids on human endothelial cells [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2008, 18(2): 96-104.
- [2] van den Oever IA, Raterman HG, Nurmohamed MT, et al. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus [J]. *Mediators Inflamm*, 2010, 2010: 792393. doi:10.1155/2010/792393.
- [3] Schmitz-Peiffer C, Biden TJ. PKCdelta blues for the beta-cell [J]. *Diabetes*, 2010, 59(1): 1-3.
- [4] Zhu P, Chen G, You T, et al. High FFA-induced proliferation and apoptosis in human umbilical vein endothelial cell partly through Wnt/beta-catenin signal pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 338(1-2): 123-131.
- [5] Artwohl M, Graier WF, Roden M, et al. Diabetic LDL triggers apoptosis in vascular endothelial cells [J]. *Diabetes*, 2003, 52(5): 1240-1247.
- [6] Li H, Li H, Bao Y, et al. Free fatty acids induce endothelial dysfunction and activate protein kinase C and nuclear factor-kappaB pathway in rat aorta [J]. *Int J Cardiol*, 2011, 152(2): 218-224.
- [7] Mugabo Y, Mukaneza Y, Renier G. Palmitate induces C-reactive protein expression in human aortic endothelial cells. Relevance to fatty acid-induced endothelial dysfunction [J]. *Metabolism*, 2011, 60(5): 640-648.
- [8] Basu A, Pal D. Two faces of protein kinase C delta; the contrasting roles of PKCdelta in cell survival and cell death [J]. *The Scientific World Journal*, 2010, 10: 2272-2284.
- [9] Steinberg SF. Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase C delta [J]. *Biochem J*, 2004, 384 (Pt 3): 449-459.
- [10] Brodie C, Blumberg PM. Regulation of cell apoptosis by protein kinase C delta [J]. *Apoptosis*, 2003, 8(1): 19-27.
- [11] Boccellino M, Giovane A, Servillo L, et al. Fatty acid mobilized by the vascular endothelial growth factor in human endothelial cells [J]. *Lipids*, 2002, 37(11): 1047-1051.
- [12] Nag A, Mitra G, Ghosh PC. A colorimetric assay for estimation of polyethylene glycol and polyethylene glycolated protein using ammonium ferrotiocyanate [J]. *Anal Biochem*, 1996, 237(2): 224-228.
- [13] Konishi H, Tanaka M, Takemura Y, et al. Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂ [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(21): 11233-11237.
- [14] Bai X, Margariti A, Hu Y, et al. Protein kinase C{delta} deficiency accelerates neointimal lesions of mouse injured artery involving delayed reendothelialization and vasohibin-1 accumulation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(12): 2467-2474.
- [15] Geraldes P, Hiraoka-Yamamoto J, Matsumoto M, et al. Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy [J]. *Nat Med*, 2009, 15(11): 1298-1303.

(收稿日期: 2014-10-10 修回日期: 2014-12-15)