

尼古丁对血管内皮细胞自噬的影响

马 琴 郭 蕊 闫喆一 崔桂丽 闫佳敏 王亚静

摘 要 **目的** 初步探讨尼古丁对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)自噬的影响。**方法** 采用蛋白免疫印迹(Western blot)技术分别检测尼古丁不同浓度($0, 6 \times 10^{-8}, 6 \times 10^{-7}, 6 \times 10^{-6}$ 和 6×10^{-5} mol/L)和不同时间(浓度为 6×10^{-6} mol/L 时,分别干预 0、1.5、3、6 和 12h)作用后,人脐静脉内皮细胞中自噬标志蛋白微管相关蛋白轻链 3 II (LC3 II)蛋白表达水平的变化,以确定尼古丁的最佳刺激浓度和最佳刺激时间。依据尼古丁最佳条件将体外培养的 HUVE 细胞随机分组:对照组、尼古丁处理组, Western blot 法检测 LC3 II、多聚泛素结合蛋白 p62/SQSTM1 (p62)和溶酶体相关膜蛋白-2 (LAMP-2)的蛋白表达, Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测细胞凋亡率。结果体外实验显示, LC3 II 蛋白表达呈浓度和时间依赖性,且尼古丁浓度为 6×10^{-6} mol/L、时间为 6h 时, LC3 II 蛋白表达最多($P < 0.01$)。与对照组相比,尼古丁处理组 LC3 II、p62 蛋白表达显著增加($P < 0.05$), LAMP2 蛋白表达减少($P < 0.05$), 细胞凋亡率升高($P < 0.01$)。**结论** 尼古丁可以引起自噬体与溶酶体融合障碍,使自噬降解异常,导致内皮细胞自噬功能紊乱,促进细胞凋亡。

关键词 尼古丁 人脐静脉内皮细胞 自噬 LC3 II

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.07.035

Effects of Nicotine on Utophagy in Vascular Endothelial Cells. Ma Qin, Guo Rui, Yan Zhiyi, et al. Department of Physiology, Shanxi Medical University, Shanxi 030001, China

Abstract **Objective** To explore the influence of nicotine on autophagy in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** HUVECs were firstly treated with different concentrations of nicotine ($0, 6 \times 10^{-8}, 6 \times 10^{-7}, 6 \times 10^{-6}$ and 6×10^{-5} μ mol/L). The expression of specific protein marker in autophagy microtubule-associated protein light chain3 II (LC3 II) in each group was detected with western blot and the highest level of LC3 II protein indicated the optimal stimulating concentration. Then, HUVECs were treated with nicotine for different times (0, 1.5, 3, 6 and 12h) in their optimum concentration 6×10^{-6} μ mol/L. A similar western blot detection was performed in order to determine the optimal time of nicotine. Divided HUVECs cultured in vitro randomly based on the optimum condition for nicotine: control group, nicotine treatment group. The expression of LC3 II, ubiquitin binding protein p62/SQSTM1 (p62) and lysosome membrane protein-2 (LAMP-2) protein were detected by western blotting, cell apoptosis was detected by flow cytometry (FCM) using Annexin V-FITC/PI double labeled. **Results** The expression of LC3 II protein was dose and time dependent. It expressed most ($P < 0.05$) with nicotine at the time of 6h and concentration of 6×10^{-6} mol/L. Compared with control group, nicotine treatment group had a higher level of LC3 II and p62 protein. However, the expression of LAMP-2 was decreased at the same time. **Conclusion** Nicotine impaires the fusion of autophagosomes and lysosomes, leading to autophagic clearance impairment and leading to endothelial cell autophagy function disorder. This may makes contribution to the cell apoptosis.

Key words Nicotine; Human umbilical vein endothelial cell; Autophagy; LC3 II

吸烟是心血管系统疾病发生、发展的独立危险因素。尼古丁是香烟的一种主要毒性成分,其引起内皮细胞功能紊乱被认为是吸烟诱发心血管系统疾病的一个重要机制。大量研究证实,尼古丁可以通过影响内皮细胞的凋亡、炎症、增殖和迁移等方面,进而损伤血管内皮细胞^[1-3]。自噬是广泛存在于真核细胞中降解蛋白的一种调节机制,一方面自噬可维持蛋白合

成和降解的平衡,是保障细胞发挥生物学功能的关键,可促进细胞的存活,而另一方面,自噬功能异常也可导致细胞损伤甚至死亡。但有关尼古丁对内皮细胞自噬方面的影响几乎没有文献报道。本实验旨在探究尼古丁对血管内皮细胞自噬的影响及自噬功能紊乱后对内皮细胞凋亡的影响。

材料与方法

1. 材料:人脐静脉内皮细胞(美国 Cell Application 公司),完全培养基(上海 Sciencecell 公司),尼古丁(美国 Sigma 公司),LC3 抗体(上海 Sigma 公司),

LAMP-2、p62 和 GAPDH 及辣根过氧化物酶标记的二抗(北京 Cell Signal 公司), Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(南京建成生物工程研究所), BCA 蛋白定量试剂盒(武汉博士德公司)。

2. 细胞培养: 将 HUVECs 均匀接种于含有适量完全培养基的 6 孔板中(接种密度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$), 置于 5% CO_2 、37℃ 孵箱进行培养。待细胞融合至 70% 进行实验干预。本实验所用细胞均不超过 7 代。

3. Western blot 法检测: 取对数生长期的 HUVECs, 分别加入 0 、 6×10^{-8} 、 6×10^{-7} 、 6×10^{-6} 和 $6 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 的尼古丁, 6h 后收集细胞。取对数生长期的 HUVECs, 加入 0 和 $6 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 尼古丁, 分别处理 0 、1.5、3、6 和 12h 后收集细胞。收集细胞具体步骤为: 干预结束后, 立即弃掉培养液置于冰上并用 PBS 进行冲洗, 加入配置好的裂解液进行裂解并收集在离心管中进行超声破碎及离心。用 BCA 法测定蛋白浓度并制备蛋白样本。95℃ 煮 5min, 用 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质, 使用半干转将蛋白结合转印到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1h。封闭结束后, TBST 洗膜 3 次, 每次 5min。将膜分别与相应一抗结合, 4℃ 过夜。TBST 洗膜 3 次后, 与二抗在摇床上室温共孵 1h。洗膜后即可进行压片曝光。Western blot 法检测结果均最少重复 3 次。

4. 流式细胞检测技术: 取对数生长期的 HUVECs, 分为对照组和实验组。实验组加入 $6 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 浓度尼古丁, 对照组加入等量培养基, 每组各 3 孔, 干预 6h 后, 用不含 EDTA 的胰酶进行消化, 收集细胞, 离心 5min, 1000r/min。弃去上清, 用 PBS 重悬细胞, 再次离心洗涤细胞。弃上清, 各加 Binding Buffer 震荡悬浮细胞, 加入 $5\mu\text{l}$ 的 Annexin V-FITC 和 $5\mu\text{l}$ 的 PI, 混匀并避光孵育至少 15min。加入 $200\mu\text{l}$ 的 Binding Buffer, 用流式细胞仪检测细胞凋亡率。凋亡率等于早期凋亡和晚期凋亡之和。

5. 统计学方法: 采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析。检验正态性及方差齐性检验, 计量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用 One-way ANOVA。组间采用独立样本 t 检验两两比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同浓度尼古丁促进 HUVE 细胞 LC3 II 表达增加: 设定不同尼古丁浓度测定自噬标志物 LC3 II 的表达, 以确定尼古丁最佳浓度。结果如图 1 所示, 各浓度处理组与对照组(control)相比, 差异均有统计学

意义。尼古丁浓度为 $6 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 时 LC3 II 的蛋白表达量上调显著($P < 0.01$), 表明尼古丁干预下 LC3 II 蛋白表达具有浓度依赖性。笔者以 $6 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 的尼古丁用于后续实验。

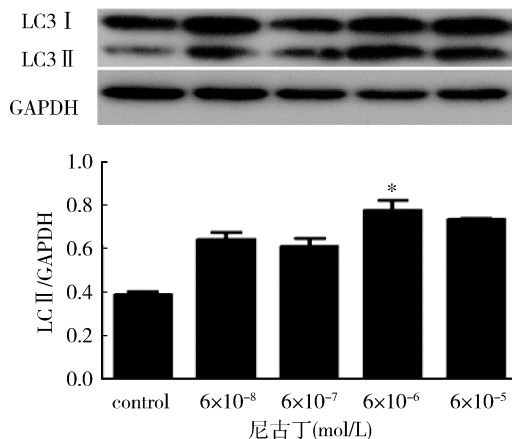


图 1 不同浓度的尼古丁对 HUVE 细胞 LC3 II 表达的影响
与 control 组比较, * $P < 0.01$

2. 不同时间尼古丁对 LC3 II 的影响: 浓度为 $6 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 尼古丁分别与 HUVEC 共孵育 0、1.5、3、6、12h, 如图 2 所示, LC3 II 在 6h 处蛋白表达量最高($P < 0.01$)。尼古丁作用下内皮细胞 LC3 II 表达具有时间依赖性。尼古丁干预最佳时间为 6h。

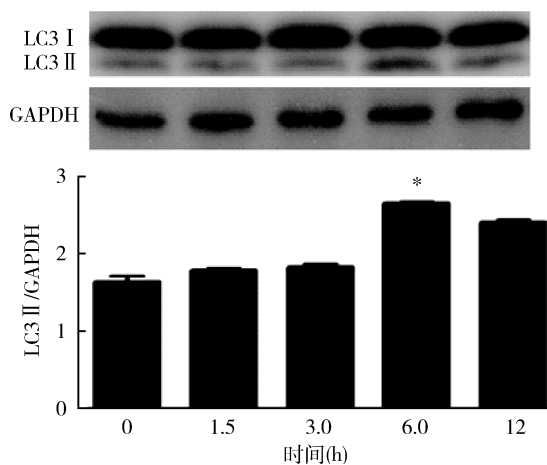


图 2 尼古丁作用不同时间后 LC3 II 的变化
与 0h 组比较, * $P < 0.01$

3. 尼古丁最适条件下 LC3 II、p62、LAMP-2 的表达: 为确定 LC3 II 的表达变化, 是自噬产生增多还是降解异常所引起的, 笔者检测此时 p62、LAMP-2 的表达。如图 3 所示, 与对照组相比, LC3 II 增高时, 处理组 p62 表达升高, LAMP-2 表达降低。提示较高浓度 $6 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 尼古丁引起 LC3 II 表达增高, 并不是自噬产生增多, 而是由于降解通路异常所引起的。

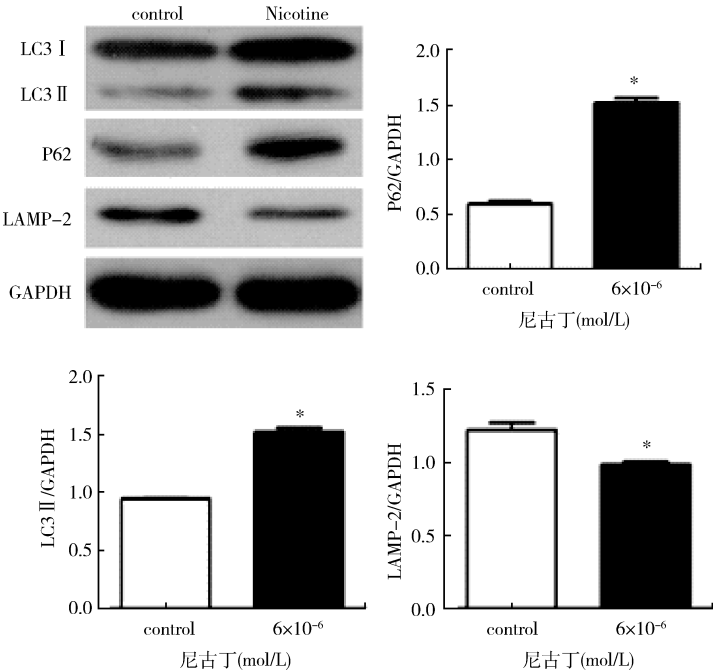


图3 尼古丁最适条件下 LC3 II 增高时,p62,LAMP - 2 的表达
与 control 组比较,* P < 0.05

4. 检测尼古丁对 HUVEC 凋亡率的影响:如图 4 所示,较高浓度 6×10^{-6} mol/L 尼古丁与 HUVEC 共孵育 6h 时,与对照组相比,凋亡率显著升高 ($P < 0.01$)。表明最适尼古丁条件下,尼古丁可能紊乱自噬正常功能,使自噬不能起到保护细胞和促进细胞存活的作用。

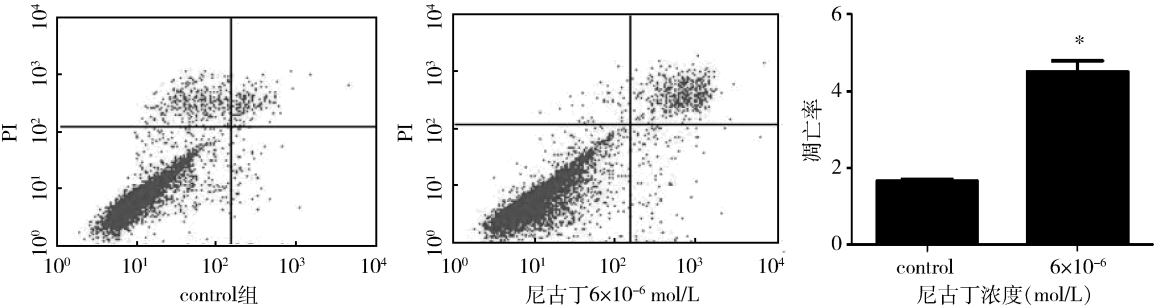


图4 尼古丁最适条件下细胞凋亡率
与 control 组比较,* P < 0.01;右下象限为早凋,右上为晚凋

讨 论

尼古丁俗称烟碱,是烟草的重要成分,可通过损伤血管内皮从而促进动脉粥样硬化等心血管疾病的发生、发展^[4,5]。本实验首次证实尼古丁可以导致自噬体和溶酶体结合障碍,降解异常,自噬紊乱,引起细胞凋亡率升高。细胞自噬是普遍存在于真核生物中,高度进化保守的对细胞内物质进行循环再利用的过程。在此过程中,主要包括产生和降解两大过程:部分蛋白质和细胞器被来源于粗面内质网的无核糖体附着区的双层膜包裹形成自噬体,自噬体与溶酶体结合形成自噬溶酶体,被运送到此的蛋白质和细胞器在

自噬溶酶体内降解。因此自噬体的增多可以是产生增多也可以是降解通路出现障碍所引起的。自噬体与 LC3 密切相关,LC3 有两种亚型:LC3 I 型和 LC3 II 型,LC3 II 是自噬体的标志分子。机体发生自噬时,胞内的 LC3 I 转化为与膜结合的 LC3 II。LC3 II 表达不会降低直至自噬体与溶酶体结合降解^[6]。本实验中,笔者检测到尼古丁作用下 LC3 II 表达升高 ($P < 0.05$),且具有时间依赖性和浓度依赖性,提示尼古丁可能提高血管内皮细胞的自噬水平或者引起内皮细胞自噬降解异常。

p62/SQSTM1 是一种泛素样结合蛋白,是自噬降

解的特异性底物之一,其C末端可选择性与泛素化蛋白结合,同时p62包含一段与LC3相互作用区域,可使泛素化蛋白经自噬途径降解,若降解通路受阻,p62与泛素在胞质中成阳性聚集^[7,8]。因此LC3Ⅱ表达升高,p62表达降低,表示自噬通畅,自噬活性增强;LC3Ⅱ表达升高,p62表达同时升高,表明自噬起始正常,但降解出现障碍。本实验中,LC3Ⅱ表达升高,p62表达同时升高,说明血管内皮细胞在较高尼古丁浓度 6×10^{-6} mol/L影响下,自噬降解通路异常。LAMP-2是溶酶体膜相关蛋白,在本实验中,LC3Ⅱ表达升高,LAMP-2表达没有升高反而降低,进一步说明自噬体与溶酶体结合异常,导致降解受阻^[9]。

细胞死亡是一种极其复杂且被周密调控的过程。凋亡是第1个被认定的程序性细胞死亡程序(programmed cell death, PCD)而被大众所熟知。近年来,越来越多的研究证实细胞自噬与凋亡共同调控细胞死亡。某些情况下,自噬功能紊乱促进细胞凋亡。Chen等^[10]发现脂多糖加剧体外培养的肺矽病巨噬细胞的凋亡伴随自噬小体的累积,这种自噬小体累积的同时伴随溶酶体膜相关蛋白-2(LAMP-2)表达的增加。Li等^[11]发现IL-24可以通过降低口腔鳞状细胞癌细胞自噬水平促进细胞凋亡。在本实验中,自噬降解异常,同时内皮细胞凋亡率增加,提示,自噬功能的紊乱可能促进细胞凋亡的增加。

综上所述,笔者初步研究了尼古丁对内皮细胞自噬的影响,较高浓度的尼古丁可以紊乱自噬体与溶酶体的结合,导致自噬降解异常,使自噬功能异常。自噬功能的紊乱可能是细胞凋亡升高的原因。总而言之,尼古丁和内皮自噬的研究将为研究心血管疾病的

发生、发展提供一个新的研究方向。

参考文献

- Yin HS, Li YJ, Jiang ZA, *et al.* Nicotine - induced ICAM - 1 and VCAM - 1 expression in mouse cardiac vascular endothelial cell via p38 MAPK signaling pathway[J]. *Anal Quant Cytopathol Histopathol*, 2014, 36(5): 258 - 262
- Wang LL, Zhao JL, Lau WB, *et al.* Estradiol pretreatment attenuated? nicotine - induced? endothelial cell? apoptosis via estradiol functional membrane receptor[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(6): 675 - 682
- Kuhlmann CR, Scharbrodt W, Schaefer CA, *et al.* Discordant effects of nicotine on endothelial cell? proliferation, migration, and the inward rectifier potassium current[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 38(2): 315 - 322
- Balakumar P, Kaur J. Is nicotine a key player or spectator in the induction and progression of cardiovascular disorders[J]? *Pharmacol Res*, 2009, 60: 361 - 368
- Mercado C, Jaimes EA. Cigarette smoking as a risk factor for atherosclerosis and renal disease: novel pathogenic insights[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2007, 9(1): 66 - 72
- Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy [M]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2009, 335: 1 - 32
- Yao TP. The role of ubiquitin in autophagy—dependent protein aggregate processing[J]. *Genes Cancer*, 2010, 1(7): 779 - 786
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 24131 - 24145
- Mello AS, Goldim MP, Mezzalana J, *et al.* LAMP2 as a marker of EBV - mediated B lymphocyte transformation in the study of lysosomal storage diseases[J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 385(1-2): 1 - 6
- Chen S, Yuan J, Yao S, *et al.* Lipopolysaccharides may aggravate apoptosis through accumulation of autophagosomes in alveolar macrophages of human silicosis[J]. *Autophagy*, 2015, 11(10): 1908 - 1927
- Li J, Yang D, Wang W, *et al.* Inhibition of autophagy by 3 - MA enhances IL - 24 - induced apoptosis in human oral squamous cell carcinoma cells[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015, 11: 84 - 97
(收稿日期: 2015 - 11 - 26)
(修回日期: 2015 - 12 - 14)
- Lee YS, Kang JW, Lee YH, *et al.* ID4 mediates proliferation of astrocytes after excitotoxic damage in the mouse hippocampus [J]. *Anat Cell Biol*, 2011, 44(2): 128 - 134
- Anna V, Wolfgang G, Marc I, *et al.* ID4 is frequently downregulated and partially hypermethylated in prostate cancer [J]. *World J Urol*, 2012, 30(3): 319 - 325
- 刘洋, 康慧媛, 王莉莉, 等. 急性白血病细胞中 ID4 基因甲基化的 PCR 定量检测系统的建立及其特异性和敏感性 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2014, 02(2): 269 - 274
- Shih - Shih C, Rainer C, Lucas DM, *et al.* Silencing of the inhibitor of DNA binding protein 4 (ID4) contributes to the pathogenesis of mouse and human CLL [J]. *Blood*, 2011, 117(3): 862 - 871
- Kuzontkoski PM, Mulligan - Kehoe MJ, Harris BT, *et al.* Inhibitor of DNA binding - 4 promotes angiogenesis and growth of glioblastoma multiforme by elevating matrix GLA levels [J]. *Oncogene*, 2010, 29(26): 3793 - 3802
(收稿日期: 2015 - 12 - 08)
(修回日期: 2016 - 01 - 05)

(上接第 178 页)

- Jeon H, Jin XJ, Oh S, *et al.* Inhibitor of differentiation 4 drives brain tumor - initiating cell genesis through cyclin E and notch signaling [J]. *Genes Dev*, 2008, 22(15): 2028 - 2033
- Tokuzawa Y, Yagi K, Yamashita Y, *et al.* Id4, a new candidate gene for senile osteoporosis, acts as a molecular switch promoting osteoblast differentiation [J]. *PLoS Genet*, 2010, 6(7): e1001019
- Crippa E, Lusa L, De CL, *et al.* miR - 342 regulates BRCA1 expression through modulation of ID4 in breast cancer [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e87039 - e87039
- Paola DC, Muzaffar A, Robert B, *et al.* Id4 messenger RNA and estrogen receptor expression: inverse correlation in human normal breast epithelium and carcinoma [J]. *Hum Pathol*, 2006, 37(8): 1032 - 1041
- Best SA, Hutt KJ, Nai Yang F, *et al.* Dual roles for Id4 in the regulation of estrogen signaling in the mammary gland and ovary [J]. *Development*, 2014, 141(16): 3159 - 3164