

高甘油三酯对人主动脉平滑肌细胞凋亡和炎症因子的影响

蒲丽君, 刘杰, 胡厚祥

(川北医学院附属医院心血管病研究室, 四川 南充 637000)

【摘要】目的: 探讨高甘油三酯 (HTG) 对人主动脉平滑肌细胞 (HASMC) 凋亡和炎症因子白细胞介素 6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的影响。**方法:** 不同浓度的甘油三酯 (TG) 干预 HASMC 24 h, 采用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法检测细胞抑制率; 流式细胞仪检测细胞凋亡; Western blot 检测 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 蛋白的表达水平; 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测 IL-6 和 TNF- α 的水平。**结果:** 与对照组相比, TG 2.5 mmol/L 和 5 mmol/L 组凋亡率增加 ($P < 0.05$), 且 TG 5 mmol/L 组凋亡率高于 2.5 mmol/L 组 ($P < 0.05$), 而 TG 1 mmol/L 组凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$); TG 处理细胞后, 2.5 mmol/L 和 5 mmol/L 组中 Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), Caspase-3 蛋白表达均升高 ($P < 0.05$), 2.5 mmol/L 和 5 mmol/L 组中 IL-6 和 TNF- α 浓度均升高 ($P < 0.05$), 呈浓度依赖性。**结论:** 中高浓度 TG 可促进 HASMC 凋亡, 促使炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的产生增加。

【关键词】 动脉粥样硬化; 高甘油三酯; 主动脉平滑肌细胞; 凋亡; 炎症因子; Bcl-2; Caspase-3

【中图分类号】 R541.4 **【文献标志码】** A

Effects of high triglyceride on apoptosis and inflammatory factors of human aortic smooth muscle cells

PU Li-jun, LIU Jie, HU Hou-xiang

(Cardiovascular Research Center, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To observe the effects of high triglyceride (HTG) on apoptosis of human aortic smooth muscle cells (HASMC) and inflammatory factors interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor α (TNF- α). **Methods:** HASMC was treated with different concentrations of triglyceride (TG) for 24h. The cell inhibition rate was detected by MTT assay, cell apoptosis was detected by flow cytometry, protein expression of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Caspase-3 was detected by Western blot, and the levels of IL-6 and TNF- α were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results:** Compared with the control group, the apoptosis rate of TG 2.5 mmol/L and 5 mmol/L groups was increased ($P < 0.05$), and the apoptosis rate of TG 5 mmol/L group was higher than that of 2.5 mmol/L group ($P < 0.05$), there was no statistical difference in the apoptosis rate of TG 1 mmol/L group ($P > 0.05$). After TG treatment, Bcl-2 protein expression was decreased in 2.5 mmol/L and 5 mmol/L groups ($P < 0.05$), Caspase-3 protein expression was increased ($P < 0.05$), the concentrations of IL-6 and TNF- α in 2.5 mmol/L and 5 mmol/L groups were increased ($P < 0.05$) in a concentration-dependent manner. **Conclusion:** Medium and high concentrations TG can promote the apoptosis of HASMC and increase the production of inflammatory factors IL-6 and TNF- α .

【Key words】 Atherosclerosis; High triglyceride; Aortic smooth muscle cells; Apoptosis; Inflammatory factors; Bcl-2; Caspase-3

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种血管壁的慢性炎症性疾病, 是各种心血管疾病发生、发展的病理生理基础^[1]。血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 作为动脉壁的主要成分, 其凋亡^[2]和炎症反应^[3]在 AS 的发病及进展中发挥重要作用。血脂异常与 AS 密切相关, 其中高甘油三酯 (HTG) 是最常见的脂代谢异常。AS 与甘油三酯

(TG) 的代谢异常息息相关, 对于动脉粥样硬化性心血管疾病 (atherosclerotic cardiovascular disease, ASCVD) 的风险评估有重要作用。但 TG 与 ASCVD 确切关系仍有争议, 其机制尚未清楚。既往研究^[4]指出中链甘油三酯对 VSMCs 增殖具有双向作用, 但 HTG 对于 VSMCs 凋亡和炎症因子的影响目前研究较少。因此, 本研究以 HASMC 为研究对象, 观察

基金项目: 四川省南充市市校科技战略合作项目 (18SXHZ0349)

作者简介: 蒲丽君 (1978 -), 女, 硕士, 副主任医师。E-mail: pushanshan1978@163.com

通讯作者: 胡厚祥, 博士, 主任医师。E-mail: huxiang17@163.com

HTG 对 HASMC 凋亡和炎症因子 IL-6、TNF- α 表达的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

HASMC 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。甘油三酯 (G1904231) 购自 Bomei, DMEM 高糖培养基和胰酶购自美国 Hyclone 公司,胎牛血清购自美国 Gibco 公司,MTT 购自 Biofrox 公司,二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自美国 Sigma 公司,放射性免疫沉淀评价 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) 细胞裂解液和 BCA 蛋白浓度测定购自碧云天公司,增强型化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 试剂盒购自 Affinity 公司,兔抗人 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) (A0208)、兔抗人胱天蛋白酶-3 (Caspase-3, A0214) 及兔抗人 β -actin (AC026) 抗体购自 ABCclone 公司,生物素化山羊抗兔 IgG (H + L) (ab6721) 购自美国 abcam 公司。

1.2 实验分组及药物处理

将人主动脉平滑肌细胞 (human aortic smooth muscle cells, HASMC) 分为对照组和实验组,实验组又分为 TG 1 mmol/L 组、2.5 mmol/L 组和 5 mmol/L 组,实验组分别采用 TG 1.0 mmol/L、2.5 mmol/L 和 5.0 mmol/L 刺激细胞 24 h。

1.3 MTT 检测细胞增殖

收集对数生长期大鼠主动脉平滑肌细胞 (rat aortic smooth muscle cell, RASMC) 接种于 96 孔板 (5×10^4 个/孔), 每组设置 3 个复孔。干预结束后,吸除培养液,每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μ L,继续培养 4h,弃上清,每孔加入 DMSO 150 μ L,室温避光孵育 5 min,用酶标仪在 570 nm 波长处测定各孔的吸光值。细胞增殖抑制率 = $[1 - (\text{实验组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值})] \times 100\%$ 。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期的 HASMC 接种于 6 孔板 (1×10^5 个/孔),设置组别对照组、1 mmol/L 组、2.5 mmol/L 组、5 mmol/L 组,每组重复 3 次,干预 24 h 后,将上清液吸入 15 mL 离心管中,用磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 洗涤细胞 1 次,用不含乙二胺四乙酸 (EDTA) 胰酶消化收集细胞悬液,离心收集细胞沉淀,将细胞液移入 1.5 mL EP 管中,离心 5 min,吸除上清液,PBS 洗涤两次,用 500 μ L 的 Binding Buffer 重悬细胞后,加入 5 μ L Annexin APC 轻轻吹匀,再加入 5 μ L 的碘化丙锭 (PI) 混匀;室温避光反应 15 min,上机检

测分析。

1.5 Western blot 检测 Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达

HASMC 干预 24 h 后提取蛋白,用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,然后通过蛋白质免疫印迹 (WB) 检测相关蛋白的表达水平。每个样品以 20 μ g 蛋白上样,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 电泳后转移至聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 膜上,用 5% 脱脂牛奶溶液室温封闭 2 h,分别加入一抗 Bcl-2 (1:500)、Caspase-3 (1:2 000) 和 β -actin (1:100 000),在 4 $^{\circ}$ C 摇床上孵育过夜,用 Tris-HCl- NaCl-Tween 20 缓冲液 (TBST) 将 PVDF 膜洗 3 次,每次 5 min,将 PVDF 膜放入二抗 (1:5 000) 中,摇床上轻摇,室温孵育 2 h,用 TBST 再洗膜 3 次,每次 5 min。用 ECL 发光剂显影。再用 Image J 软件分析条带灰度值,结果以 Bcl-2/ β -actin 和 Caspase-3/ β -actin 的比值表示。实验重复 3 次,取平均值。

1.6 ELISA 检测白细胞介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平

收集各组细胞培养上清液,采用 ELISA 法检测 IL-6、TNF- α 的水平,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多样本均数间比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 检验,多组间两两比较,方差齐采用 LSD 检验,方差不齐则采用 Tamhane's T2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TG 对 HASMC 细胞增殖抑制的影响

与对照组比较,TG 1 mmol/L 组抑制增殖率降低 ($P < 0.05$),具有促进细胞增殖作用,TG 2.5 mmol/L 和 5 mmol/L 组增殖抑制率增加 ($P < 0.05$),呈浓度依赖性。与 TG 1 mmol/L 组比较,TG 2.5 mmol/L 和 5 mmol/L 组增殖抑制率增加 ($P < 0.05$),呈浓度依赖性。与 TG 2.5 mmol/L 比较,TG 5 mmol/L 组增殖抑制率增加 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 TG 对 RASMC 凋亡的影响

与对照组比较,TG 1 mmol/L 组凋亡率降低,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),TG 2.5 mmol/L 和 5 mmol/L 组凋亡率增加 ($P < 0.05$),且 TG 5 mmol/L 组凋亡率高于 TG 2.5 mmol/L 组 ($P < 0.05$);与 TG 1 mmol/L 组比较,TG 2.5 mmol/L 和 5 mmol/L 组凋亡率增加 ($P < 0.05$)。见表 1 及图 1。

2.3 TG 对 Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达的影响

与对照组相比, TG 1 mmol/L 组中 Bcl-2 蛋白表达比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), TG 2.5 mmol/L 和 5 mmol/L 组中 Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 与 TG 1 mmol/L 比较, TG 2.5 mmol/L 组中 Bcl-2 蛋白表达降低, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 5 mmol/L 组中 Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。与对照组比较, TG 1 mmol/L、2.5 mmol/L 和 5 mmol/L 组中 Caspase-3 蛋白表达升高 ($P < 0.05$); 与 TG 1 mmol/L 组比较, TG 2.5 mmol/L 和 5 mmol/L 组中 Caspase-3 蛋白表达升高 ($P < 0.05$);

与 TG 2.5 mmol/L 比较, TG 5 mmol/L 组中 Caspase-3 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。见图 2 及表 2。

表 1 不同组别细胞凋亡结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	HASMC 凋亡率 (%)	RASMC 凋亡率 (%)
对照组 ($n=3$)	0	0.47 ± 0.067
TG 1 mmol/L 组 ($n=3$)	10.54 ± 0.18 *	0.41 ± 0.076
TG 2.5 mmol/L 组 ($n=3$)	3.34 ± 0.073 * #	2.45 ± 0.26 * #
TG 5 mmol/L 组 ($n=3$)	8.99 ± 0.13 * # Δ	4.45 ± 0.47 * # Δ

* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与 TG 1 mmol/L 组比较; Δ $P < 0.05$, 与 TG 2.5 mmol/L 组比较。

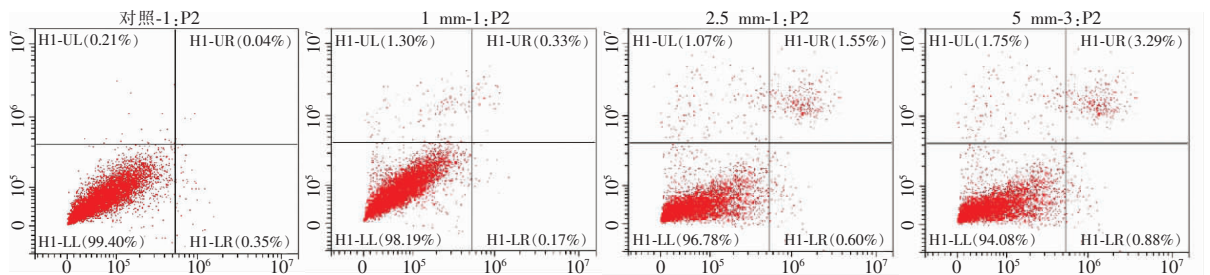


图 1 TG 对各组 HASMC 细胞凋亡的影响

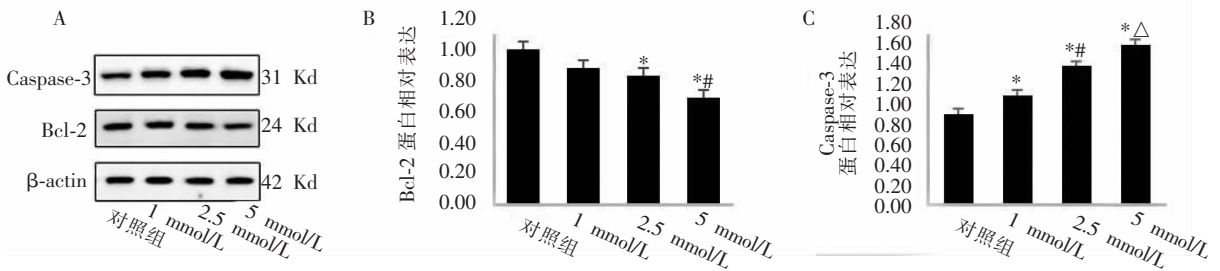


图 2 WB 检测各组细胞 Bcl-2、Caspase-3 蛋白相对表达水平比较

A. 不同组别的 WB 示意图; B. Bcl 蛋白相对表达水平; C. Caspase-3 蛋白相对表达水平。* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与 TG 1 mmol/L 组比较; Δ $P < 0.05$, 与 TG 2.5 mmol/L 组比较。

表 2 各组 Bcl-2、Caspase-3 蛋白相对表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2	Caspase-3
对照组 ($n=3$)	0.99 ± 0.075	0.87 ± 0.18
TG 1 mmol/L 组 ($n=3$)	0.87 ± 0.062	1.05 ± 0.11 *
TG 2.5 mmol/L 组 ($n=3$)	0.80 ± 0.048 *	1.33 ± 0.10 * #
TG 5 mmol/L 组 ($n=3$)	0.69 ± 0.12 * #	1.54 ± 0.14 * # Δ

* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与 TG 1 mmol/L 组比较; Δ $P < 0.05$, 与 TG 2.5 mmol/L 组比较。

表 3 各组细胞上清液中 IL-6、TNF-α 浓度比较 ($\bar{x} \pm s$, pg/mL)

组别	IL-6	TNF-α
对照组 ($n=3$)	3.10 ± 0.25	6.01 ± 0.16
TG 1 mmol/L ($n=3$)	3.10 ± 0.26	6.04 ± 0.34
TG 2.5 mmol/L ($n=3$)	3.52 ± 0.10 *	6.54 ± 0.14 *
TG 5 mmol/L ($n=3$)	4.53 ± 0.11 * #	7.57 ± 0.20 * #

* $P < 0.05$, 与对照组比较; # $P < 0.05$, 与 TG 1 mmol/L 组比较; # $P < 0.05$, 与 TG 2.5 mmol/L 组比较。

2.4 TG 对炎症因子 IL-6 和 TNF-α 水平影响

与对照组相比, TG 1 mmol/L 组上清液中 IL-6 和 TNF-α 浓度比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 而 TG 2.5 mmol/L 和 5 mmol/L 组中 IL-6 和 TNF-α 浓度均升高 ($P < 0.05$); 与 TG 2.5 mmol/L 比较, TG 5 mmol/L 组中 IL-6 和 TNF-α 浓度升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

3 讨论

AS 是各种心血管疾病发生、发展的病理生理基础, 严重威胁着人类健康, 发生机制复杂。VSMCs 作为血管中膜的主要细胞类型之一, 其增殖和凋亡的平衡贯穿 AS 全过程^[5]。既往研究^[6-8]多聚焦于 VSMCs 的增殖与迁移, 而近年来, 越来越多的研究

表明 AS 的形成过程也与 VSMCs 等细胞的凋亡密切相关^[9]。Clarke 等^[10]指出,对小鼠血管中膜和内膜的 VSMCs 进行凋亡诱导后,AS 斑块中出现纤维帽变薄、细胞碎片堆积和内膜炎症等现象,VSMCs 凋亡与 AS 斑块的不稳定性密切相关。AS 患者的 VSMCs 凋亡率高,与粥样斑块不稳定有关^[11]。但是 VSMCs 凋亡与 AS 形成的具体机制尚未清楚。因此,深入研究其凋亡调控机制有望为 AS 的预防和治疗提供新的参考靶点。

HTG 是临床上常见的一个全球性公共健康问题,它对各种心脑血管疾病的发生与发展都起着重要的作用。HTG 是否是致 AS 和冠心病的独立危险因素是近年来该领域关注的热点,目前仍存在有争议。HTG 血浆可促进 VSMCs 的增殖,减少凋亡^[12-13];但中链甘油三酯对大鼠血管平滑肌细胞的增殖具有双向作用^[4],即在低浓度短时间促进增殖作用,在中、高浓度抑制增殖作用,且凋亡可能与中链甘油三酯的抑制细胞增殖作用无关。Bcl-2/Caspase-3 信号通路在调控细胞凋亡过程中至关重要,Bcl-2 具有抗凋亡作用,Caspase-3 活化后可促进细胞凋亡,且 Bcl-2 抑制 Caspase-3 的活性以减少细胞凋亡。本研究显示,中、高浓度 TG 可通过促进 Caspase-3 表达并抑制 Bcl-2 表达来促进 HASMC 凋亡,且具有浓度依赖性,但低浓度 TG 对 HASMC 凋亡无明显影响,即便其可促进 HASMC 增殖,究其原因可能与 AS 晚期斑块不稳定及炎症因子浸润等因素有关。

此外,炎症在 AS 的发生、发展中发挥重要作用^[14]。TNF- α 又称为前炎症细胞因子,是启动炎症反应最为重要的细胞因子,IL-6 是一种具有多重效应细胞因子,在机体免疫代谢过程中起关键作用。本研究发现,中、高浓度 TG 可上调炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的表达水平,并且呈浓度依赖性,与既往研究^[15-17]基本一致,TG 促使 AS 病变晚期 HASMC 凋亡增加与炎症反应的程度有关。

综上,中、高浓度 TG 可通过促进 Caspase-3 表达及并抑制 Bcl-2 表达来促进 HASMC 凋亡,且具有浓度依赖性。

参考文献

[1] Chen L, Ishigami T, Doi H, *et al.* Gut microbiota and atherosclerosis; Role of B cell for atherosclerosis focusing on the gut-immune-B2 cell axis [J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2020, 98 (9): 1235 - 1244.

- [2] Grootaert MOJ, Moulis M, Roth L, *et al.* Vascular smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis [J]. *Cardiovascular Research*, 2018, 114 (4): 622 - 634.
- [3] Ali L, Schnitzler JG, Kroon J. Metabolism: The road to inflammation and atherosclerosis [J]. *Current Opinion in Lipidology*, 2018, 29 (6): 474 - 480.
- [4] 秧茂盛, 王雅琴. 中链甘油三酯对血管平滑肌细胞增殖的双向作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24 (6): 551 - 556.
- [5] Singh BR, Mengi SA, Xu YJ, *et al.* Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process [J]. *Experimental & Clinical Cardiology*, 2002, 7 (1): 40 - 53.
- [6] 谢岩, 任志文, 赵冬. miR-125b 在颈动脉粥样硬化患者外周血单个核细胞中的表达及其对血管平滑肌细胞增殖和迁移的影响 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2017, 52 (3): 295 - 299.
- [7] 赵曦雯, 张玉梅. miR-92a 通过靶向抑制 PTEN 的表达促进血管平滑肌细胞的增殖以及迁移 [J]. *成都医学院学报*, 2019, 14 (2): 163 - 168.
- [8] Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis [J]. *Circulation Research*, 2016, 118 (4): 692 - 702.
- [9] Basatemur GL, Jorgensen HF, Clarke MCH, *et al.* Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis [J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2019, 16 (12): 727 - 744.
- [10] Clarke M, Bennett M. The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis and plaque stability [J]. *American Journal of Nephrology*, 2006, 26 (6): 531 - 535.
- [11] Brunzell JD. Clinical practice. Hypertriglyceridemia [J]. *New England Journal of Medicine*, 2007, 357 (10): 1009 - 1017.
- [12] 罗雪磊, 周晓霞, 苏佩清, 等. 黄芩茎叶总黄酮对高甘油三酯血清刺激的 VSMCs 增殖的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34 (21): 2803 - 2806.
- [13] 周晓霞, 周晓慧, 杨鹤梅, 等. 高甘油三酯血清促血管平滑肌细胞的增殖作用 [J]. *中华心血管病杂志*, 2000, 28 (4): 316.
- [14] Ridker PM. Residual inflammatory risk: Addressing the obverse side of the atherosclerosis prevention coin [J]. *European Heart Journal*, 2016, 37 (22): 1720 - 1722.
- [15] Ali L, Schnitzler JG, Kroon J. Metabolism: The road to inflammation and atherosclerosis [J]. *Current Opinion in Lipidology*, 2018, 29 (6): 474 - 480.
- [16] Bories GFP, Leitinger N. Macrophage metabolism in atherosclerosis [J]. *FEBS Letters*, 2017, 591 (19): 3042 - 3060.
- [17] Yvan CL, Ivanov S. Metabolic reprogramming of macrophages in atherosclerosis: Is it all about cholesterol? [J]. *Journal of Lipid and Atherosclerosis*, 2020, 9 (2): 231 - 242.

(收稿日期: 2022-04-01

修回日期: 2022-05-19)