

· 基础研究 ·

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯通过抑制 PI3K/AKT 信号通路损害人冠状动脉内皮细胞的功能

孙立富, 季宇萌, 王旭枫, 余冬敏, 李 奔, 路 鹏, 王晓伟*

南京医科大学第一附属医院心脏大血管外科, 江苏 南京 210029

[摘要] **目的:**探究邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯[di(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP]暴露对 PI3K/AKT 信号通路和人冠状动脉内皮细胞(human coronary artery endothelial cell, HCAEC)的影响,探索 DEHP 暴露致 HCAEC 损伤的机制。**方法:**根据相关文献研究,用不同浓度 DEHP 处理 HCAEC,设置对照组(DMSO)和实验组(DEHP 128、256、384、512 $\mu\text{mol/L}$)。用 CCK-8 法测定细胞增殖能力;体外成管实验评估细胞成管能力;流式细胞术评估细胞凋亡水平;Western blot 检测细胞中 p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT 和凋亡相关蛋白 BAX、Bcl-2、cleaved Caspase-3、Caspase-3 的水平。**结果:**CCK-8 结果显示,DEHP 以浓度和时间依赖的方式抑制 HCAEC 的增殖($P < 0.05$)。体外成管实验结果显示,实验组细胞形态多呈孤立的圆形、卵圆形,当 DEHP 浓度 $\geq 256 \mu\text{mol/L}$ 时,其形成交点数目较对照组减少($P < 0.05$)。流式细胞实验结果显示,实验组凋亡比例较对照组上升($P < 0.05$)。Western blot 结果显示实验组 Bcl-2 表达水平较对照组降低,同时 BAX 和 cleaved Caspase-3/Caspase-3 的水平升高($P < 0.05$);当 DEHP $\geq 256 \mu\text{mol/L}$ 时,p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 比值较对照组降低($P < 0.05$)。**结论:**DEHP 可通过抑制 PI3K/AKT/信号通路诱导 HCAEC 凋亡,抑制其增殖、血管形成能力。

[关键词] 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯;人冠状动脉内皮细胞;凋亡;PI3K/AKT

[中图分类号] R329.28

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2022)11-1507-08

doi:10.7655/NYDXBNS20221102

Di-(2-ethylhexyl) phthalate impairs the functions of human coronary artery endothelial cells by inhibiting PI3K/AKT signal pathway

SUN Lifu, JI Yumeng, WANG Xufeng, YU Dongmin, LI Ben, LU Peng, WANG Xiaowei*

Department of Cardiovascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the effects of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) exposure on PI3K/AKT signal pathway and human coronary artery endothelial cells (HCAECs), and to provide a theoretical basis for the treatment of HCAECs damaged by DEHP exposure. **Methods:** According to relevant literature research, HCAECs were treated with different concentrations of DEHP and divided into control group (DMSO) and experimental group (DEHP 128, 256, 384, 512 $\mu\text{mol/L}$). The ability of cell proliferation was measured by CCK-8 assay, the ability of cell tube formation was evaluated by *in vitro* tube formation assay, the level of apoptosis was evaluated by flow cytometry, and the levels of p-PI3K, PI3K, p-AKT, AKT and apoptosis-related proteins BAX, Bcl-2, cleaved Caspase-3 and Caspase-3 were detected by Western blot. **Results:** CCK-8 assay showed that DEHP inhibited the proliferation ability of HCAECs in a concentration- and time-dependent manner ($P < 0.05$). The results of *in vitro* tube formation assay showed that the morphology of cells in the experimental group was mostly isolated round and oval. The number of intersections formed was reduced compared with the control group ($P < 0.05$) when the DEHP concentration was $\geq 256 \mu\text{mol/L}$. The results of flow cytometry showed that the proportion of apoptosis in the experimental group was higher than that in the control group ($P < 0.05$). Western blot results showed that the expression level of Bcl-2 in the experimental group was lower than that in the control group, while the levels of BAX and

[基金项目] 国家自然科学基金(81773445, 81573234);江苏省“333”工程项目(LGY2016006);江苏省卫生健康委医学科科研项目(ZDA2020004)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangxiaowei@njmu.edu.cn

cleaved Caspase-3/Caspase-3 increased ($P < 0.05$). And the ratio of p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT were lower than those in the control group ($P < 0.05$) when DEHP $\geq 256 \mu\text{mol/L}$. **Conclusion:** DEHP can induce apoptosis and inhibit the proliferation and angiogenesis of HCAECs by inhibiting PI3K/AKT/ signal pathway.

[Key words] DEHP; human coronary artery endothelial cell; apoptosis; PI3K/AKT

[J Nanjing Med Univ, 2022, 42(11): 1507-1514]

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯[di(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP]是一种邻苯二甲酸酯类,因其弹性高、可塑性强,常被用作增塑剂添加于各种聚氯乙烯产品中,如医疗器械、药品和食品容器、儿童玩具和工业塑料等,以提高产品的柔韧性和耐久性^[1]。DEHP以非共价化学键与聚氯乙烯结合,在温度、使用时间和pH值等外部条件变化时,它可以不断地从产品中解离,污染水、食物、土壤、植物和沉积物等^[2]。DEHP可经多种途径进入人体,如口鼻吸入、直接经口食入、皮肤吸收和在医疗活动中直接进入循环系统等^[3]。DEHP具有疏水亲脂性,易从聚氯乙烯产品渗入至含脂肪类食物、含有脂质的溶液等,接触血液后更容易转移至血液^[4]。因此,在接受塑料材料的侵入性医治(包括体外循环、体外膜肺氧合、透析和输血治疗)后,可以观察到患者体内DEHP水平升高。如接受输血治疗的成年人血液内DEHP浓度上升,为72.5~295.2 $\mu\text{g/mL}$ (相当于185~755 $\mu\text{mol/L}$)^[5]。DEHP及其代谢产物进入人体后会对内分泌系统、生殖系统、呼吸系统、神经系统等多个系统器官产生毒性作用^[1]。多项流行病学调查研究表明DEHP可以扩散到心脏,对心脏节律和心肌细胞产生影响,尚未有研究关注DEHP对心脏的滋养血管即心肌血管的影响^[1,5-6]。

心肌血管是滋养心肌的血管,负责心肌中氧合血液和去氧血液的有效输送和排出^[7]。所有心肌血管内衬一层单层、极性排列的内皮细胞,该层内皮细胞参与多种生理功能,如调节新血管形成、维持血管舒张性、维持血液流动性、调节血管壁通透性、抑制血管中促炎因子和凝血因子的激活等^[8-9]。内皮细胞功能异常导致多种并发症,如凝血增强、细胞黏附、炎症激活、脂蛋白跨内皮运输及血管异常收缩和舒张等^[10]。细胞凋亡是受到生物体严格调控的程序性死亡,能够维持各种组织和器官的稳定^[11]。血管内皮细胞长期暴露在各种循环应激源的作用下,必须在凋亡和存活之间保持平衡,以保持内皮的完整性^[12]。在病理条件下,内皮细胞凋亡是动脉粥样硬化的始动步骤,将导致随后的动脉粥样硬化发生发展^[13]。已有研究表明DEHP暴露可以增加老

年人群冠状动脉粥样硬化的风险^[14]。

磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT)信号通路存在于所有哺乳动物细胞中,并受细胞外信号的调控,对维持细胞正常功能起着至关重要的作用^[15-16]。PI3K的激活可以磷酸化AKT,磷酸化的AKT(p-AKT)可以进一步激活下游靶点调节细胞存活,包括Bcl-2家族蛋白(如Bcl-2、BAX)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶家族蛋白(如Caspase-3)^[17]。鉴于内皮细胞在血管中的重要地位,用不同剂量DEHP处理人冠状动脉内皮细胞(human coronary artery endothelial cell, HCAEC),通过凋亡、血管形成等实验观察其对HCAEC功能的影响,并初步探索PI3K/AKT信号通路在DEHP致HCAEC损伤中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

HCAEC(武汉Fine Text公司)。Dulbecco改良Eagle培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、青霉素和链霉素(Gibco公司,美国)。DEHP(Sigma-Aldrich公司,美国)。CCK-8试剂和Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(南京诺维赞公司)。抗p-PI3、PI3K、p-AKT、AKT抗体(Cell Signaling Technology公司,美国),抗BAX、Bcl-2、cleaved Caspase-3、Caspase-3、GAPDH抗体(上海艾比马特公司)。二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(北京索莱宝公司)。磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂(Roche公司,瑞士)。Matrigel基质胶(Corning公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及DEHP染毒

向高糖DMEM中加入FBS和青霉素-链霉素双抗,使FBS和青霉素-链霉素双抗的终浓度分别为10%和1%,配制完全培养基。HCAEC用完全培养基培养接种于无菌培养皿中,置于细胞培养箱常规培养,设定温度在37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 浓度在5%,每2 d更换1次培养基。DEHP染毒实验,选取生长良好处于对数生长期的细胞,以DMSO为阴性对照组,实验组参

考相关研究的染毒时间和DEHP浓度^[5, 18-20],将DEHP溶解稀释于DMSO,再与培养基混合,将DEHP稀释成128、256、384、512 μmol/L,使HCAEC染毒(DMSO终浓度低于0.1%),模拟DEHP暴露。

1.2.2 细胞增殖-毒性实验

CCK-8试剂盒检测DEHP对细胞增殖能力的影响。将细胞以2 000个/孔的密度接种在96孔板中,过夜后用显微镜观察,细胞贴壁生长良好,弃去原有培养基后,设置空白对照组(无细胞仅有培养基)、阴性对照组(DMSO)、实验组(DEHP 128、256、384、512 μmol/L),每组5个复孔,染毒后将96孔板放回培养箱继续培养12、24、48、72 h。染毒结束后,向每个孔加入10 μL CCK-8溶液,继续孵育2 h,2 h后用酶标仪检测各组细胞在450 nm处吸光度值,各组结果表示为相应阴性对照组细胞活力的百分比,根据下列公式计算:(A-C)/(B-C)×100%(A:实验组吸光度值,B:阴性对照组吸光度值,C:空白对照组吸光度值)。

1.2.3 体外成管实验

制备细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL。按照每孔50 μL将细胞悬液滴加到预先涂有基质胶的96孔板中,设置对照组(DMSO)、实验组(DEHP 128、256、384、512 μmol/L)。轻轻震荡,使细胞分布均匀。在培养箱中常规培养6 h。用倒置显微镜观察拍摄细胞成管情况,用Image J软件分析图片结果,定义至少3条管的交汇处为1个交点,以交点数目表示各组成管结果。

1.2.4 流式细胞实验

用Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒检测DEHP对HCAEC凋亡的影响。6孔板常规培养细胞,设置对照组(DMSO)、实验组(DEHP 128、256、384、512 μmol/L),在培养箱中常规培养染毒72 h。染毒结束后,用不含乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)的胰酶消化并收集细胞。细胞用预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)漂洗2次后,用100 μL结合缓冲液重悬细胞,加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI染色液室温(20~25 ℃)避光孵育10 min。孵育结束后,加入400 μL结合缓冲液,轻轻混匀。此外,用未经处理的细胞样品作为阴性对照,用DEHP 256 μmol/L组的细胞分别进行Annexin V-FITC和PI单染。

在1 h内用流式细胞仪检测细胞样品,在双色流式细胞仪散点图上,早期凋亡细胞散在分布于右下象限,晚期凋亡细胞散在分布于右上象限。存活

细胞和坏死细胞分别散布在左下象限和左上象限。定义各组结果为:凋亡率=早期凋亡率+晚期凋亡率。

1.2.5 蛋白质印迹实验(Western blot)

用Western blot评估凋亡相关蛋白(Bcl-2、cleaved Caspase-3、Caspase-3、BAX)及通路蛋白(p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT)的表达水平。细胞染毒72 h后,吸去培养基,用预冷的PBS冲洗细胞。每组细胞用细胞裂解液(RIPA)裂解,裂解液中添加磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂。4 ℃裂解2 h后,将样品在4 ℃下以15 000 r/min离心20 min。使用增强的BCA蛋白质测定试剂盒测量上清液中蛋白质浓度,添加5×上样缓冲液后在100 ℃下变性15 min,分装冻存。通过10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,并转移至0.45 μm聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜。然后,5%牛血清白蛋白封闭缓冲液室温下封闭2 h,按照蛋白Marker位置与目标蛋白分子量裁剪PVDF膜,与相应的一抗在4 ℃下孵育过夜。抗体包括Bcl-2(1:1 000)、BAX(1:1 000)、cleaved Caspase-3(1:1 000)、Caspase-3(1:1 000)、GAPDH(1:1 000)、p-PI3K(1:1 000)、PI3K(1:1 000)、p-AKT(1:1 000)、AKT(1:1 000)。第2天在脱色摇床上用添加0.1% Tween-20的Tris缓冲盐水将PVDF膜洗涤3次,每次15 min,在室温下二抗孵育2 h,然后使用上述方法再次洗涤3次。使用增强的化学发光试剂,用自动化学发光图像分析系统曝光免疫反应条带。通过Image J软件v1.53测量每个条带的积分密度,分析相应样品中目的蛋白/GAPDH或磷酸化蛋白/总蛋白的比例来计算相对蛋白表达含量。

1.3 统计学方法

用Excel 2019进行数据录入,SPSS 26.0进行数据的统计学分析,GraphPad Prism 8进行柱状图和折线图的绘制。本研究各组数据为正态分布且方差齐,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)形式表示,两组间比较采用*t*检验,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LSD检验。以双侧 $\alpha=0.05$ 为显著性检验标准, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DEHP暴露对HCEAC细胞形态的影响

倒置显微镜观察可见(图1A),72 h时,实验组

和对照(DMSO)组细胞均为单层贴壁生长,呈现卵圆形或鹅卵石外观,边界清楚,胞浆丰富,细胞核清晰。实验组整体细胞密度较对照组减低,实验组小部分细胞胞浆内出现空泡状结构,细胞变大且结构松散,细胞核增大。

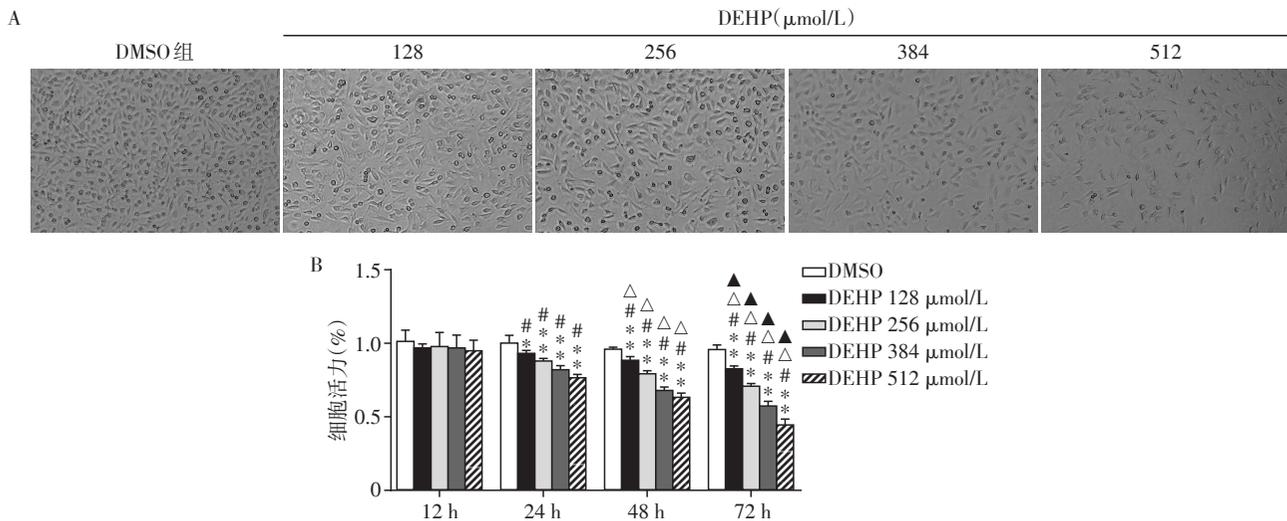
2.2 DEHP抑制HCAEC的增殖

CCK-8法观察DEHP对HCAEC增殖能力的影响。对DEHP浓度及染毒时间分别进行了单独效应检测。染毒12 h时,与对照(DMSO)组相比,实验组的细胞活力差异无统计学意义($P > 0.05$)。染毒时间为24、48、72 h时,与对照(DMSO)组相比,实验组各浓度DEHP(128、256、384、512 $\mu\text{mol/L}$)均能够抑制细胞的增殖能力($P < 0.05$,图1B),随着DEHP浓度的增加,细胞活力依次降低,且DEHP 128、256、384、512 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞活力相互之间的差异均有统计学意义($P < 0.05$)。随着时间的延长,对照

(DMSO)组细胞活力仅有轻微降低,各个时间点之间差异无统计学意义($P > 0.05$,图1B)。随着染毒时间的延长,各实验组各时间点细胞活力依次降低,各时间点细胞活力相互之间的差异均有统计学意义($P < 0.05$)。上述结果表明DEHP可抑制HCAEC的增殖能力,并且染毒时间越长、DEHP浓度越高,毒性作用越明显,具有时间和浓度依赖性。

2.3 DEHP抑制HCAEC血管形成能力

体外成管实验能够在一定程度上模拟血管发生过程,通过观察细胞形成管腔的情况,评估DEHP对HCAEC血管形成能力的影响。对照(DMSO)组细胞多呈现为拉长的梭形,互相连接成网状,形成的管状结构在6 h时趋于稳定,随着时间的延长逐渐崩解。实验组细胞多呈现孤立的圆形、卵圆形,散乱分布在视野中(图2A)。与对照(DMSO)组相比,DEHP 128 $\mu\text{mol/L}$ 组形成的交点数目减少,但是



A: HCAEC暴露于不同浓度DEHP(128、256、384、512 $\mu\text{mol/L}$)72 h后的细胞形态学观察($\times 40$); B: HCAEC暴露于不同浓度DEHP(128、256、384、512 $\mu\text{mol/L}$)、不同时间(12、24、48、72 h)后细胞增殖能力的情况,与同时间点DMSO组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与12 h组比较,# $P < 0.05$;与24 h组比较,△ $P < 0.05$;与48 h组比较,▲ $P < 0.05$ ($n=3$)。

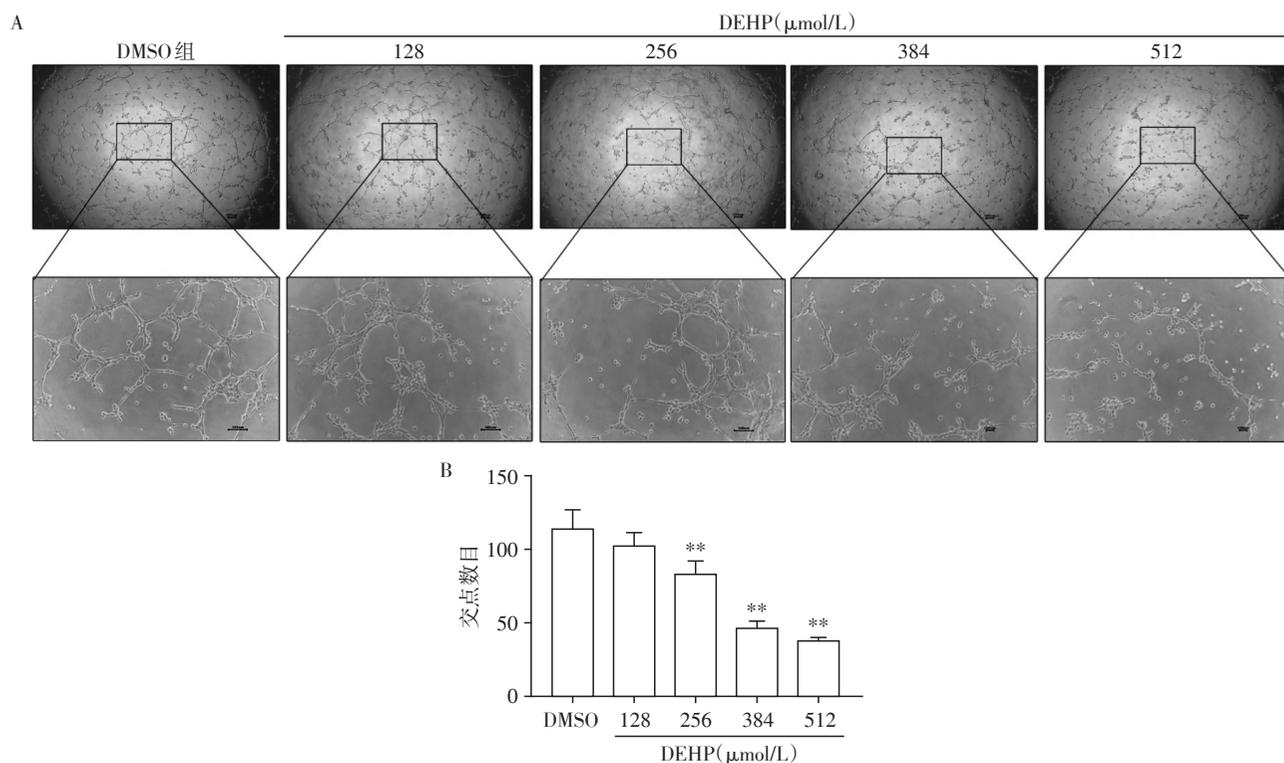
图1 DEHP暴露对HCAEC细胞形态和增殖能力的影响

Figure 1 Effects of DEHP exposure on cell morphology and proliferation of HCAEC

差异无统计学意义($P > 0.05$)。DEHP 256、384、512 $\mu\text{mol/L}$ 组形成交点数目进一步减少,与对照(DMSO)组相比,差异有统计学意义($P < 0.01$,图2B)。以上结果说明DEHP可以抑制HCAEC的血管形成能力,具有浓度依赖性。

细胞凋亡是由基因控制的细胞自主有序的死亡,为了评价DEHP对HCAEC凋亡的影响,进行了细胞流式实验。与对照(DMSO)组相比,各实验组凋亡细胞比例增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图3A、B)。后续检测了凋亡相关蛋白的表达水平,

Western blot实验结果显示,与对照组Bcl-2表达水平相比,各实验组Bcl-2表达水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$,图3C、D);与对照(DMSO)组BAX表达水平相比,DEHP 128 $\mu\text{mol/L}$ 组BAX表达水平降低,但是其差异无统计学意义($P > 0.05$)。DEHP 256、384、512 $\mu\text{mol/L}$ 组BAX表达水平增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与对照(DMSO)组cleaved Caspase-3/Caspase-3比值相比,各实验组比值上升,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。以上结果说明DEHP可以改变凋亡相关蛋白的表达水平,诱导



A: HCAEC暴露于不同浓度DEHP(128、256、384、512 μmol/L)后的成管情况(×40); B: 体外成管实验中各组形成交点数目对比柱状图,与DMSO组比较,** $P < 0.01$ ($n=3$)。

图2 DEHP暴露对HCAEC血管形成能力的影响

Figure 2 The effect of DEHP exposure on the angiogenesis ability of HCAEC

HCAEC的凋亡。

2.4 DEHP抑制PI3K/AKT信号通路

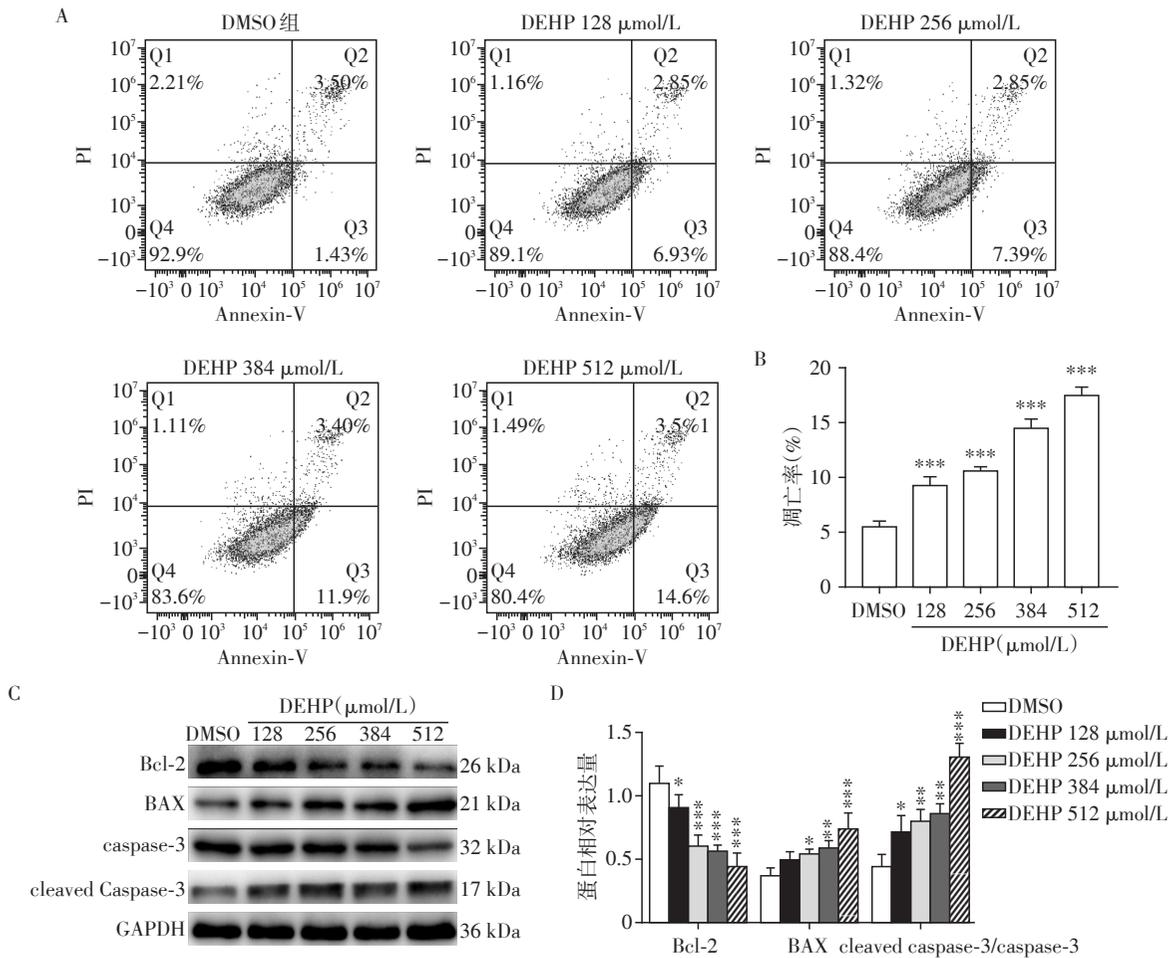
为了探究上述结果的可能原因,进行了Western blot实验,各组PI3K、AKT水平差异无统计学意义($P > 0.05$,图4A)。当DEHP浓度 $\geq 256 \mu\text{mol/L}$ 时,实验组p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT比值较对照组降低,差异有统计学意义($P < 0.05$,图4B)。上述结果说明,DEHP可以降低关键蛋白的磷酸化水平,抑制PI3K/AKT通路。

3 讨论

随着聚氯乙烯制品的广泛应用,DEHP的产量逐年上升,年产量已超过200万吨^[1]。DEHP是美国食品和药物协会批准的医疗器械中最常用的增塑剂,应用于储血袋、管道回路、肠内营养管、气管插管等。生活中进入人体的DEHP的量与生活方式和医疗器械的使用情况相关,接受医疗措施患者的血液DEHP浓度往往较高^[21]。输血治疗后成年人血液DEHP浓度为72.5~295.2 μg/mL,儿童输血治疗后血液DEHP浓度则更高,为27.6~405 μg/mL(DEHP 100 μg/mL=256 μmol/L)^[5]。成人冠状动脉搭桥和心

脏移植手术DEHP暴露剂量分别为1.0、2.4 mg/(kg·d),成人和儿童进行体外循环手术时DEHP的暴露量分别为3.0、14.0 mg/(kg·d),均超过人体耐受剂量即0.6 mg/(kg·d)^[22]。美国环保局数据显示,20 μg/(kg·d)的DEHP暴露剂量即有造成肝脏肿大的风险,欧洲食品安全局报告称,50 μg/(kg·d)的DEHP暴露剂量可能具有睾丸毒性^[1]。

近年,DEHP的心血管毒性受到关注。研究显示,体外DEHP灌流大鼠心脏,可使其心率变慢、单位时间内冠脉流量下降^[23]。流行病学调查显示,DEHP暴露可导致青少年左室收缩压升高、心律失常^[24-25],增加老年人群冠状动脉粥样硬化的风险,尿液DEHP水平亦与检测到的血管斑块回声成正相关^[14]。对载脂蛋白E缺陷的小鼠给予DEHP灌胃,4周后小鼠表现出高脂血症、动脉粥样硬化加重和动脉内皮细胞的炎症损伤。动脉内皮细胞衬于血管内壁,它的凋亡被认为是动脉粥样硬化的始动因素之一,抑制内皮细胞凋亡可能是一种潜在的治疗动脉粥样硬化的策略^[13]。因此,本研究根据临床患者可能的DEHP暴露情况和相关文献记载,建立了HCAEC的DEHP暴露模型^[5,18-19],观察DEHP暴露



A: HCAEC 暴露于不同浓度 DEHP(128、256、384、512 μmol/L)后凋亡情况; B: 流式细胞实验中各组凋亡率比较; C: HCAEC 暴露于不同浓度 DEHP(128、256、384、512 μmol/L)后凋亡相关蛋白 Western-blot 结果图; D: 凋亡相关蛋白相对表达量。与 DMSO 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ ($n=3$)。

图3 DEHP 暴露对 HCAEC 凋亡及凋亡相关蛋白表达情况的影响

Figure 3 Effects of DEHP exposure on apoptosis and the expression of apoptosis-related proteins in HCAEC

对 HCAEC 的影响及可能机制。

内皮细胞是心血管的重要组成部分,是血管快速新生和维持内皮层完整性的基础^[26]。CCK-8 结果表明,DEHP 能够以时间和剂量依赖的方式抑制 HCAEC 增殖能力。体外成管实验中,6 h 时实验组交点数目比对照组减少,而染毒时间 ≤ 12 h 实验组和对照组增殖能力差异无统计学意义,说明 DEHP 可以在不影响增殖的情况下对 HCAEC 血管形成能力产生抑制。

Western blot 结果显示实验组和对照组 PI3K、AKT 差异无统计学意义。DEHP 浓度 ≥ 256 μmol/L 时,实验组 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 较对照组降低,差异有统计学意义,说明 DEHP 可降低 PI3K/AKT 信号通路关键蛋白的磷酸化。生理情况下 PI3K 的激活可以磷酸化和激活 AKT,通过与其 PH 域结合,导致 AKT 移位到细胞膜的内表面^[27-28]。磷酸化的 AKT

(p-AKT)可以进一步调节下游信号,如 Bcl-2 家族蛋白(如 Bcl-2、BAX)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶家族蛋白(如 Caspase-3)^[29-30]。Caspase-3 在多条凋亡信号转导通路中发挥重要作用。Caspase-3 以酶原形式存在于细胞质中,在细胞凋亡的早期被剪切激活,剪切的 Caspase-3(cleaved Caspase-3)会引起一系列的级联反应,激活核酸内切酶,分解 DNA 片段,最终诱导细胞凋亡。Bcl-2 和 Bax 是 Bcl-2 家族成员中的一对凋亡调控基因,参与细胞线粒体凋亡途径的调控机制。Bax 和 Bcl-2 主要作用于线粒体膜。Bax 是一种促凋亡基因,可促进线粒体释放细胞色素 C,从而促进细胞凋亡。Bcl-2 是一种抗凋亡基因,可以抑制细胞色素 C 的释放,并拮抗 Bax 的促凋亡作用^[31-32]。本研究结果显示,与对照(DMSO)组相比,实验组 Bcl-2 降低,同时 BAX 和 cleaved Caspase-3/Caspase-3 增加,与对照组差异有统计学意义($P <$

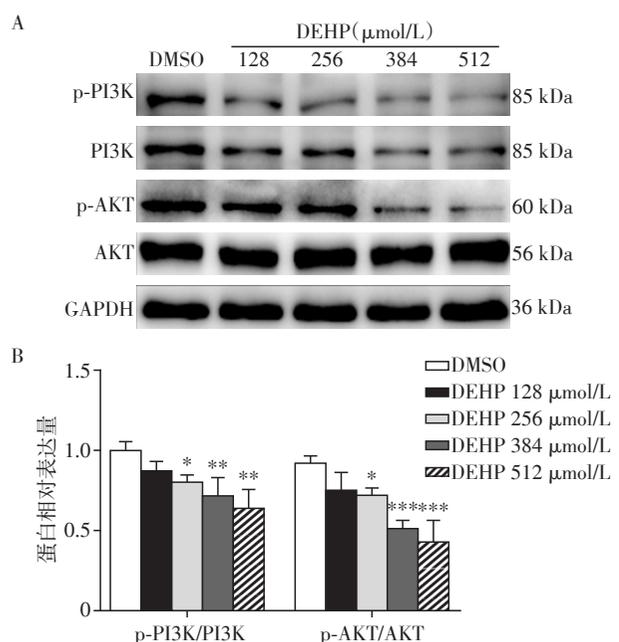


图4 DEHP对PI3K/AKT信号通路的影响
Figure 4 Effects of DEHP on PI3K/AKT signaling pathway

0.05)。此结果与流式细胞实验相符,与对照(DMSO)组相比,实验组细胞凋亡比例上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。DEHP对HCAEC凋亡的诱导作用,恰恰反映其毒性的可调控性,从细胞凋亡角度,PI3K/AKT参与DEHP诱导的HCAEC凋亡,提示其可能作为将来治疗研究的一个切入点。

本研究表明,以临床患者可能接触的DEHP剂量作用于HCEAC,可以通过抑制PI3K/AKT信号通路诱导其凋亡,抑制其增殖、成管能力(图5),这将为寻求临床DEHP暴露致HCAEC损伤的治疗方法提供理论基础。

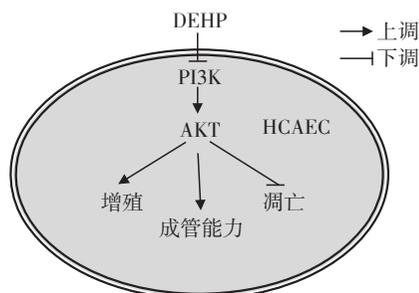


图5 DEHP通过抑制PI3K/AKT信号通路抑制HCAEC增殖、成管能力,诱导其凋亡
Figure 5 DEHP inhibits the proliferation and tube formation, induces apoptosis of HCAEC by inhibiting PI3K/AKT signaling pathway

[参考文献]

- [1] ROWDHWAL S S S, CHEN J. Toxic effects of Di-2-ethylhexyl phthalate: an overview [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018:1750368
- [2] ARUKWE A, IBOR O R, ADEOGUN A O. Biphasic modulation of neuro- and interrenal steroidogenesis in juvenile African sharptooth catfish (Clarias gariepinus) exposed to waterborne di-(2-ethylhexyl) phthalate [J]. Gen Comp Endocrinol, 2017, 254:22-37
- [3] AMARA I, TIMOUMI R, ANNABI E, et al. Di(2-ethylhexyl) phthalate induces cardiac disorders in BALB/c mice [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2019, 26(8):7540-7549
- [4] INOUE K, HIGUCHI T, OKADA F, et al. The validation of column-switching LC/MS as a high-throughput approach for direct analysis of di(2-ethylhexyl)phthalate released from PVC medical devices in intravenous solution [J]. J Pharm Biomed Anal, 2003, 31(6):1145-1152
- [5] JAIMES R, MCCULLOUGH D, SIEGEL B, et al. Plasticizer interaction with the heart: chemicals used in plastic medical devices can interfere with cardiac electrophysiology [J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2019, 12(7):e007294
- [6] HILLMAN L S, GOODWIN S L, SHERMAN W R. Identification and measurement of plasticizer in neonatal tissues after umbilical catheters and blood products [J]. N Engl J Med, 1975, 292(8):381-386
- [7] 高熠洲, 陆小虎, 徐晓晗, 等. 全动脉化与单根动脉冠状动脉搭桥围手术期疗效对比研究 [J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2021, 41(6):885-888
- [8] ERDOGDU O, NATHANSON D, SJÖHOLM A, et al. Endin-4 stimulates proliferation of human coronary artery endothelial cells through eNOS-, PKA- and PI3K/Akt-dependent pathways and requires GLP-1 receptor [J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 325(1-2):26-35
- [9] BHASIN M, YUAN L, KESKIN D B, et al. Bioinformatic identification and characterization of human endothelial cell-restricted genes [J]. BMC Genomics, 2010, 11:342
- [10] RASK-MADSEN C, KING G L. Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes [J]. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2007, 3(1):46-56
- [11] ELMORE S. Apoptosis: a review of programmed cell death [J]. Toxicol Pathol, 2007, 35(4):495-516
- [12] AMPEM P T, SMEDLUND K, VAZQUEZ G. Pharmacological evidence for a role of the transient receptor potential canonical 3 (TRPC3) channel in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis of human coronary artery endothelial cells [J]. Vascul Pharmacol, 2016, 76:42-52

- [13] ZHOU T, CHEN X. Long intergenic noncoding RNA p21 mediates oxidized LDL induced apoptosis and expression of LOX1 in human coronary artery endothelial cells [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6):8513–8519
- [14] LIND P M, LIND L. Circulating levels of bisphenol A and phthalates are related to carotid atherosclerosis in the elderly [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 218(1):207–213
- [15] KIM E H, SURESH M. Role of PI3K/Akt signaling in memory CD8 T cell differentiation [J]. *Front Immunol*, 2013, 4:20
- [16] COOKE J P, LOSORDO D W. Nitric oxide and angiogenesis [J]. *Circulation*, 2002, 105(18):2133–2135
- [17] CUI Y, FENG N, GU X, et al. κ -Opioid receptor stimulation reduces palmitate-induced apoptosis via Akt/eNOS signaling pathway [J]. *Lipids Health Dis*, 2019, 18(1):52
- [18] ZHANG Y, SHI G, CAI J, et al. Taxifolin alleviates apoptotic injury induced by DEHP exposure through cytochrome P450 homeostasis in chicken cardiomyocytes [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 183:109582
- [19] ZHANG B, LI X, ZHANG X, et al. Role of Notch pathway in effect of mono-2-ethylhexyl phthalate on the proliferation and cell cycle of SH-SY5Y cell [J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36(9):1944–1952
- [20] AN L. Exposure to mono (2-ethylhexyl) phthalate facilitates apoptosis and pyroptosis of human endometrial microvascular endothelial cells through NLRP3 inflammasome [J]. *J Appl Toxicol*, 2021, 41(5):755–764
- [21] CALAFAT A M, NEEDHAM L L, SILVA M J, et al. Exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate among premature neonates in a neonatal intensive care unit [J]. *Pediatrics*, 2004, 113(5):429–434
- [22] 陈琳, 钱青, 张喆, 等. 医疗途径中增塑剂 DEHP 的溶出及其安全性研究概况 [J]. *中国药房*, 2011, 22(33):3073–3075
- [23] ARONSON C E, SERLICK E R, PRETI G. Effects of di-2-ethylhexyl phthalate on the isolated perfused rat heart [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1978, 44(1):155–169
- [24] TRASANDE L, ATTINA T M. Association of exposure to di-2-ethylhexylphthalate replacements with increased blood pressure in children and adolescents [J]. *Hypertension*, 2015, 66(2):301–308
- [25] BARRY Y A, LABOW R S, KEON W J, et al. Perioperative exposure to plasticizers in patients undergoing cardiopulmonary bypass [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1989, 97(6):900–905
- [26] KAWASAKI K, SMITH R S, HSIEH C M, et al. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(16):5726–5737
- [27] ZHANG L, ZHOU F, TEN DIJKE P. Signaling interplay between transforming growth factor- β receptor and PI3K/AKT pathways in cancer [J]. *Trends Biochem Sci*, 2013, 38(12):612–620
- [28] NARLA G, SANGODKAR J, RYDER C B. The impact of phosphatases on proliferative and survival signaling in cancer [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(15):2695–2718
- [29] FENG M, LI J, WANG J, et al. High glucose increases LPS-induced DC apoptosis through modulation of ERK1/2, AKT and Bax/Bcl-2 [J]. *BMC Gastroenterol*, 2014, 14:98
- [30] LI J B, WANG H Y, YAO Y, et al. Overexpression of microRNA-138 alleviates human coronary artery endothelial cell injury and inflammatory response by inhibiting the PI3K/Akt/eNOS pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(8):1482–1491
- [31] MAES M E, SCHLAMP C L, NICKELLS R W. BAX to basics: How the BCL2 gene family controls the death of retinal ganglion cells [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2017, 57:1–25
- [32] MEI J M, NIU C S. Effects of CDF on 6-OHDA-induced apoptosis in PC12 cells via modulation of Bcl-2/Bax and caspase-3 activation [J]. *Neurol Sci*, 2014, 35(8):1275–1280

[收稿日期] 2022-02-27

(本文编辑:陈汐敏)