

PEDF对低氧状态下人支气管上皮细胞表达 VEGF 的影响

吴桢珍, 查王健, 陈菲菲, 杨光宇, 黄 茂*

(南京医科大学附属第一医院呼吸内科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究色素上皮衍生因子(PEDF)对低氧状态下人支气管上皮细胞(HBE)分泌血管内皮生长因子(VEGF)的影响,并探讨该作用与缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)的相关性。方法:体外培养的HBE细胞取第3~7代用于实验,氯化钴(CoCl_2)100 $\mu\text{mol/L}$ 模拟缺氧状态。实验分为4组:正常对照组(A组)、氯化钴干预组(B组)、氯化钴+PEDF 50 ng/ml干预组(C组)及氯化钴+PEDF 200 ng/ml干预组(D组)。RT-PCR法检测各组细胞HIF-1 α 及VEGF在mRNA水平上的表达差异;ELISA及Western blot法检测各组细胞VEGF蛋白表达水平;细胞免疫荧光染色法(IF)检测各组细胞HIF-1 α 蛋白在细胞质和细胞核中的表达情况。结果:①B组VEGF的mRNA水平较A组显著升高[为A组的(8.56 \pm 0.67)倍, $P < 0.01$],C组与D组的VEGF mRNA水平较B组明显下降 ($P < 0.01$);B组HIF-1 α mRNA的表达水平较A组明显升高 ($P < 0.01$),B、C、D 3组间HIF-1 α mRNA无统计学差异;②细胞培养基上清中B组VEGF表达量[(1 370.10 \pm 42.98)pg/ml]较A组[(670.00 \pm 23.35) pg/ml]明显升高($P < 0.01$),且B组与C组[(816.19 \pm 37.05) pg/ml]及D组[(646.47 \pm 22.70)pg/ml]比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。③Western blot结果显示B组VEGF的蛋白表达量为A组的(3.99 \pm 0.37)倍,差异有统计学意义($P < 0.01$);C组与D组VEGF的蛋白表达水平较B组明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。④IF结果显示,B组HIF-1 α 的表达水平及核内转移较A组和D组明显升高。结论:PEDF对低氧状态下HBE细胞高表达的VEGF具有一定抑制作用,且该抑制作用可能与PEDF调控HIF-1 α 有关。

[关键词] 哮喘;色素上皮衍生因子;缺氧诱导因子1 α ;血管内皮生长因子

[中图分类号] R562.25

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)04-422-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140404

Effects of PEDF on the expression of VEGF in hypoxic human bronchial epithelial cells

Wu Zhenzhen, Zha Wangjian, Chen Feifei, Yang Guangyu, Huang Mao*

(Department of Respiratory Disease, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of pigment epithelium derived factor (PEDF) on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in hypoxic human bronchial epithelial (HBE) cells, and to determine whether the expression of VEGF is associated with the expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α in cultured cells. **Methods:** The cultured HBE cells between 3rd to 7th generations were used in the study, and 100 $\mu\text{mol/L}$ cobalt (II) chloride hexahydrate (CoCl_2) were used to simulate anaerobic condition. There were four groups in the study: control (group A), CoCl_2 100 $\mu\text{mol/L}$ (group B), CoCl_2 100 $\mu\text{mol/L}$ + PEDF 50 ng/ml (group C) and CoCl_2 100 $\mu\text{mol/L}$ + PEDF 200 ng/ml (group D). The expression of HIF-1 α and VEGF mRNA were detected by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression of VEGF in the different groups were examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot. Immunofluorescence (IF) was performed to test the expression of HIF-1 α in cytoplasm and cytotblast. **Results:** ①The level of VEGF mRNA was significantly elevated(8.56 \pm 0.67)-fold in group B compared with that in group A ($P < 0.01$), which was decreased in group C and group D ($P < 0.01$) compared with that in group B. Compared with group A, the level of HIF-1 α mRNA was elevated significantly in group B ($P < 0.01$). However, there were no significant differences of HIF-1 α mRNA level among group B, C and D. ②The concentration of VEGF protein in cell cultural supernatant was higher in group B [(1 370.10 \pm 42.98)pg/ml, $P < 0.01$] than that in group A [(670.00 \pm 23.35)pg/ml]. The levels of VEGF in group C [(816.19 \pm 37.05)pg/ml] and group D [(646.47 \pm 22.70)pg/ml] were decreased compared with group B ($P < 0.01$). ③The level of VEGF

[基金项目] 江苏高校优势学科建设工程项目

*通信作者(Corresponding author), E-mail: hm6114@126.com

protein detected by Western blot in group B was (3.99 ± 0.37) fold of that in group A ($P < 0.01$), and there were significant differences between group B and the other two groups (group C and D, $P < 0.05$). ④ IF showed that the level of HIF-1 α protein and the nuclear translocation of HIF-1 α in group B were significantly increased compared with those in group A and D. **Conclusion:** PEDF could inhibit the overexpressed VEGF expression in hypoxic HBE cells, and this effect may be related to PEDF-regulated HIF-1 α .

[Key words] asthma; pigment epithelium-derived factor; hypoxia inducible factor-1 α ; vascular endothelial growth factor

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(04):422-426]

支气管哮喘(简称哮喘)是一种气道慢性炎症性疾病,病情持续性进展可引起气道重塑。气道重塑是以平滑肌增生肥厚、杯状细胞增生、上皮纤维化及新生血管形成等为特征的气道结构性改变,可致气道不可逆的气流受限。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)不仅可增加血管通透性,还可促进血管内皮细胞增殖、分化从而促进新生血管形成,因此在哮喘气道重塑中发挥促进作用^[1-2]。在低氧条件下,VEGF 受缺氧诱导因子 1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1)的转录调控,HIF-1 通过与 VEGF 启动子上的缺氧反应原件结合从而增加 VEGF 的表达^[1,3]。色素上皮衍生因子(pigment epithelium-derived factor, PEDF)是内源性的强大抗血管重塑因子,可显著下调 VEGF 的表达^[4-6],但其对于低氧状态下人支气管上皮细胞(human bronchial epithelial cells, HBE)表达 VEGF 的影响作用及机制尚不明确。本研究通过氯化钴模拟低氧状态,探讨 PEDF 对低氧 HBE 细胞表达 VEGF 的影响,并研究这一作用与 HIF-1 α 的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料

胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、RPMI-1640 培养基、0.25%胰蛋白酶、氯化钴(Gibco 公司,美国);BCA 蛋白含量检测试剂盒(Thermo 公司,美国);TRIzol(Invitrogen 公司,美国);重组 PEDF 细胞因子(Pepro Tech 公司,美国);HIF-1 α 抗体(Novus 公司,美国);VEGF 抗体(Abcam 公司,英国);山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗(南京 Bioworld 公司);Real Time PCR-SYBR Green(TaKaRa 公司,日本);Human VEGF ELISA 试剂盒(RD 公司,美国);Western 一抗稀释液、免疫染色封闭液、抗小鼠 FITC、Hoechst 染色液(上海碧云天公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

HBE 细胞购自中国医学科学院肿瘤细胞库。隔

天使用含有 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基进行换液,取第 3~7 代细胞用于实验。待细胞生长汇合约达 70%用无血清培养基饥饿过夜,致各组细胞同步于 G0 期。按照不同干预方式分为 4 组:正常对照组(A 组)、氯化钴干预组(B 组)、氯化钴+PEDF 50 ng/ml 干预组(C 组)及氯化钴+PEDF 200 ng/ml 干预组(D 组)。氯化钴的干预浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$, PEDF 在氯化钴诱导缺氧前 40 min 加入培养基。

1.2.2 PCR 法检测各组 HIF-1 α 及 VEGF mRNA 的表达

氯化钴干预 2 h 后,用 TRIzol 法分别提取各组细胞总 RNA,经浓度测量和稀释后逆转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。本研究 PCR 引物序列为:①HIF-1 α 上游引物:5'-TTGCTCATCAG-TTGCCACTTCC-3',下游引物:5'-AGCAATTCAT-CTGTGCTTTCATGTC-3';②VEGF 上游引物:5'-AGGGCAGAATCATCACGAAGT-3',下游引物:5'-AGGGTCTCGATTGGATGGCA-3';③GAPDH 上游引物:5'-CCACTCCTCCACCTTTGAC-3',下游引物:5'-ACCCTGTTGCTGTAGCCA-3'。普通 PCR 法反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,35 个循环后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。实时荧光定量 PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s,共 40 个循环进行 PCR 反应。结果用 7500 software V2.0.5 软件进行数据分析。

1.2.3 ELISA 法检测各组细胞培养基上清中 VEGF 的表达

氯化钴干预 24 h 后提取各组细胞培养基,3 000 r/min 离心 10 min 后取上清 1 ml,分装后置于一 80 $^{\circ}\text{C}$ 低温冰箱。按照说明书步骤进行操作,以标准品的浓度梯度和吸光度值描绘标准曲线后计算各组细胞培养基上清中 VEGF 的表达水平。

1.2.4 Western blot 法检测各组 VEGF 的表达水平

氯化钴干预 24 h 后提取细胞总蛋白,测量各组细胞的蛋白浓度,用细胞裂解液初步校正浓度差异。

蛋白加入上样缓冲液后沸水煮 5~10 min 致蛋白变性。制备 10%聚丙烯酰胺凝胶用于电泳,每孔上样约 30 μg。电泳条件为 80 V 恒压;电泳结束后转印至硝酸纤维素膜,250 mA 转膜 120 min;之后用 5%的脱脂奶粉室温封闭 2 h;相应的一抗孵育过夜;TBST 洗膜;室温孵育二抗 2 h;洗膜后用 ECL 发光液显影。以 GAPDH 为内参校正各组蛋白上样量,Image Lab 软件分析条带灰度值。

1.2.5 IF 法检测 HIF-1α 在各组细胞中的表达

细胞爬片至密度为 50%,用无血清培养基饥饿过夜。次日氯化钴干预 4 h 后用 4%的多聚甲醛对各组细胞进行固定。之后主要步骤为:1%Triton 穿孔、免疫染色封闭液封闭、一抗 4℃孵育过夜、二抗室温孵育 1 h、Hoechst 染核。完成后用激光共聚焦显微镜观察 HIF-1α 在 HBE 细胞质及细胞核中的表达。

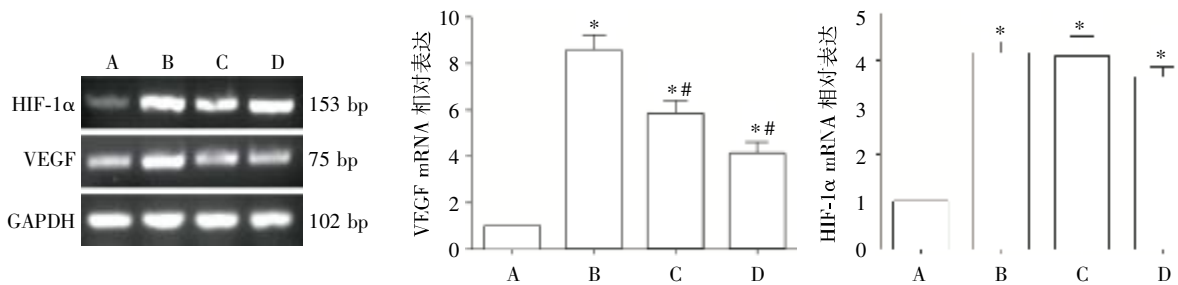
1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 统计软件进行分析,各计量资料指标均用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间差异显著性检验采用单因素方差分析,两两之间比较采用 SNK 法检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HBE 细胞 VEGF 及 HIF-1α mRNA 的表达

普通 PCR 与实时荧光定量 PCR (图 1B、C)结果均显示:与 A 组相比,B 组 HBE 细胞 VEGF mRNA 的表达量明显升高,为 A 组的(8.56 ± 0.67)倍($P < 0.01$,图 1);C 组与 D 组 VEGF mRNA 的表达水平均较 B 组明显下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。B 组 HIF-1α 的 mRNA 水平为 A 组的(4.15 ± 0.25)倍($P < 0.01$);B、D、C 3 组间 HIF-1α 表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。



A: 正常对照组;B:氯化钴 100 μmol/L;C:氯化钴 100 μmol/L+PEDF 50 ng/ml;D:氯化钴 100 μmol/L+PEDF 200 ng/ml。与 A 组比较,* $P < 0.01$;与 B 组比较,# $P < 0.01$ ($n = 3$)。

图 1 各实验组 HBEs 中 HIF-1α 和 VEGF mRNA 的表达

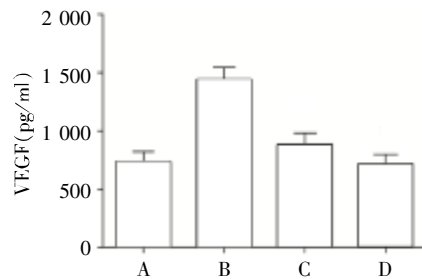
Figure 1 Comparisons of HIF-1α mRNA and VEGF mRNA expressions of HBEs among each group

2.2 HBE 细胞培养基上清中 VEGF 的表达

用 ELISA 法检测发现氯化钴干预细胞 24 h 后,与 A 组[(736.64 ± 85.70) pg/ml]相比,B 组细胞培养基上清中 VEGF 的表达水平显著升高[($1\ 436.77 \pm 109.08$) pg/ml, $P < 0.01$];C 组[(882.85 ± 100.43) pg/ml]和 D 组[(713.14 ± 86.16) pg/ml]细胞培养基上清的 VEGF 水平较 B 组明显下降,差异有统计学意义($P < 0.01$);C、D 两组的 VEGF 表达水平与 A 组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$,图 2)。

2.3 HBE 细胞中 VEGF 蛋白的表达

用 Western blot 法检测氯化钴干预 24 h 后 VEGF 蛋白在各组细胞中的表达量(图 3)。发现 B 组 VEGF 的蛋白水平为 A 组的(3.99 ± 0.37)倍,两组之间差异有统计学意义($P < 0.01$)。C 组 VEGF 的

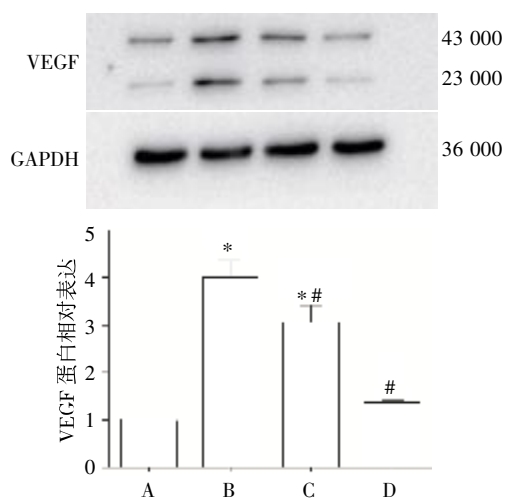


A: 正常对照组;B:氯化钴 100 μmol/L;C:氯化钴 100 μmol/L+PEDF 50 ng/ml;D:氯化钴 100 μmol/L+PEDF 200 ng/ml。与 A 组比较,* $P < 0.01$;与 B 组比较,# $P < 0.01$ ($n = 3$)。

图 2 各实验组细胞培养基上清中 VEGF 的表达

Figure 2 Comparison of VEGF protein in cell cultural supernatant among each group

蛋白水平较 B 组明显下降($P < 0.05$)。A 组与 D 组细胞 VEGF 蛋白的表达水平之间差异无统计学意义



VEGF 分子量在 43 000 左右,23 000 处为非特异性结合条带。
A: 正常对照组;B:氯化钴 100 μmol/L;C:氯化钴 100 μmol/L+PEDF 50 ng/ml;D:氯化钴 100 μmol/L+PEDF 200 ng/ml。与 A 组比较,* $P < 0.01$;与 B 组比较,# $P < 0.01$ ($n = 3$)。

图 3 各实验组细胞 VEGF 的表达

Figure 3 Comparison of VEGF protein expression in HBEs among each group

($P > 0.05$)。

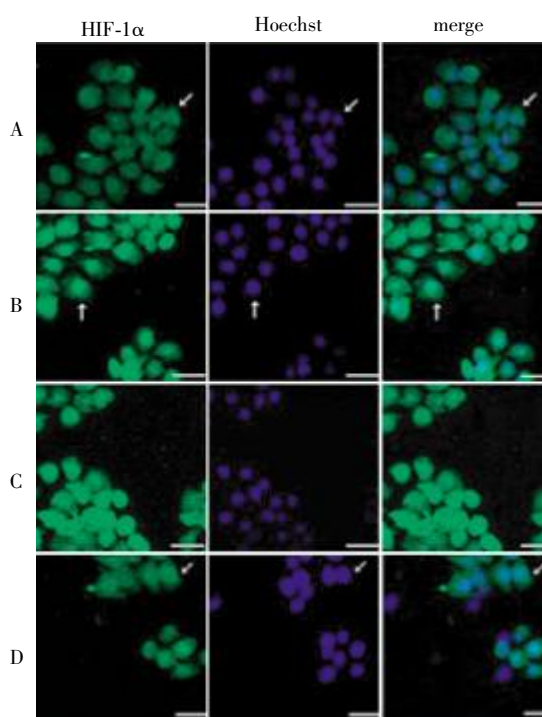
2.4 HIF-1 α 蛋白在 HBE 细胞中的表达

用激光共聚焦显微镜观察细胞质及细胞核中 HIF-1 α 蛋白的荧光强度(图 4)。A 组 HIF-1 α 蛋白的表达主要在胞质中(如箭头所示),且表达水平较低。对比 B 组可见,HIF-1 α 的表达量较 A 组明显增加,且 HIF-1 α 蛋白的核内转移量显著增加(如箭头所示)。C 组与 B 组比较,HIF-1 α 蛋白的总体表达量与核内转移均无明显差异。D 组 HIF-1 α 的蛋白表达量较 B 组下降,且 HIF-1 α 蛋白的核内转移也显著减少(如箭头所示)。

3 讨论

支气管哮喘发作期间常出现广泛多变的气道气流受限,可出现喘息、气急、胸闷及咳嗽等症状。早期气流受限为可逆性,若哮喘气道炎症得不到良好控制则可导致气道的结构性改变,即气道重塑。气道重塑不但加重哮喘症状,还会降低气道舒张剂的疗效。气道新生血管形成是气道重塑的重要特征之一,促血管生成因子和抑制血管生成因子之间的平衡失调是血管重塑的重要原因。

PEDF 是强大的内源性抑制血管生成因子,其为丝氨酸超家族的成员之一,分子量为 50 000。研究显示 PEDF 不仅在神经保护、营养、分化诱导方面有重要作用,而且由于其具有强大的抑制血管新生



A: 正常对照组;B:氯化钴 100 μmol/L;C:氯化钴 100 μmol/L+PEDF 50 ng/ml;D:氯化钴 100 μmol/L + PEDF 200 ng/ml(bars = 25 μm)。

图 4 HIF-1 α 蛋白在 HBE 细胞质及细胞核中的表达

Figure 4 Comparison of HIF-1 α protein expression in cytoplasm and cytotblast of HBEs among each group

作用^[4],故对多种肿瘤具有抑制作用^[5,7-8]。目前认为 PEDF 发挥抗血管重塑作用主要通过两种方式:其一,PEDF 诱导不成熟的血管内皮细胞在细胞膜上高表达 Fas-L 受体,从而通过 Fas/Fas-L caspase-8 途径诱导内皮细胞凋亡^[9];其二,PEDF 可显著降低 VEGF 表达水平^[10-11]。VEGF 不仅可增加血管通透性,还可促进血管内皮细胞增殖、分化从而促进新生血管形成,研究表明 VEGF 的表达增高与哮喘气道内血管重塑密切相关^[1-2]。研究发现 MAPK-VEGF 信号通路在调节内皮细胞增殖、分化和凋亡中发挥重要作用^[10,12],PEDF 对 VEGF 的抑制作用可能是通过抑制 P42/P44 的磷酸化^[10]。另外,研究显示 PEDF 可通过调控 HIF-1 α 的蛋白水平从而影响 VEGF 的表达^[5,8]。

HIF-1 的基本结构为包含 1 个 α 亚基和 1 个 β 亚基的异二聚体,其中 β 亚基在细胞中稳定表达,因此主要通过调控 α 亚基的表达量来影响 HIF-1 的水平。 α 亚基具有氧气依赖性的降解结构域,其结构中的两个脯氨酸残基的羟基化在其降解过程中起关键作用。在低氧条件下,脯氨酸残基的羟基化受到抑制,HIF-1 α 蛋白的蛋白酶降解减少,可聚集并转

移至胞核中与 HIF-1 β 形成异二聚体。此复合物随即与靶基因启动子上的缺氧反应原件(hypoxia-response element, HRE)结合,从而上调目的基因转录^[13], VEGF 即为 HIF-1 的靶基因之一。

本研究结果显示低氧状态下 HBE 细胞中 HIF-1 α 的 mRNA 及蛋白水平均显著升高,且 HIF-1 α 蛋白的核内转移也较正常组明显增加,此结果与肾小管上皮细胞^[14]及乳腺癌相关成纤维细胞^[15]在低氧条件下 HIF-1 α 的表达情况一致。本研究结果也证实了缺氧对 HBE 细胞表达 VEGF 的促进作用,这有可能是由于 HIF-1 的转录活性增加。通过对低氧状态下的 HBE 细胞外源性干预重组人 PEDF 细胞因子,发现其对 HIF-1 α 的基因水平无明显影响作用,但可显著抑制 HIF-1 α 的蛋白表达及核内转移,并且 PEDF 的干预对 VEGF 具有明显抑制作用。此结果与之前有关视网膜母细胞瘤及鼻咽癌肿瘤细胞株的研究结果一致^[5,16]。可推测 PEDF 对 HIF-1 α 的调控可能位于翻译及翻译后水平。PEDF 通过促进 HIF-1 α 蛋白在低氧环境下的降解或抑制至细胞核中的转移从而影响 HIF-1 的转录,因此对低氧状态下高表达的 VEGF 具有一定抑制作用。

综上,在低氧状态下, PEDF 作为抗血管重塑因子可能在翻译或翻译后水平调控 HBE 细胞 HIF-1 α 的水平,从而抑制 VEGF 的异常高表达。PEDF 因其对 VEGF 的强大抑制作用,可能成为调控哮喘气道重塑特别是血管重塑的重要因子。关于 PEDF 对哮喘气道重塑的抑制作用还有待体内实验进一步证实。

[参考文献]

- [1] Meyer N, Akdis CA. Vascular endothelial growth factor as a key inducer of angiogenesis in the asthmatic airways [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2013, 13(1): 1-9
- [2] Yuksel H, Yilmaz O, Karaman M, et al. Role of vascular endothelial growth factor antagonism on airway remodeling in asthma [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2013, 110(3): 150-155
- [3] Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 59(1): 47-53
- [4] Dawson DW. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis [J]. *Science*, 1999, 285(5425): 245-248
- [5] Yang H, Cheng R, Liu G, et al. PEDF inhibits growth of retinoblastoma by anti-angiogenic activity [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(12): 2419-2425
- [6] Haurigot V, Villacampa P, Ribera A, et al. Long-term retinal PEDF overexpression prevents neovascularization in a murine adult model of retinopathy [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41511
- [7] Yang J, Chen S, Huang X, et al. Growth suppression of cervical carcinoma by pigment epithelium-derived factor via anti-angiogenesis [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 9(12): 967-974
- [8] Zhang Y, Han J, Yang X, et al. Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis and growth of gastric carcinoma by down-regulation of VEGF [J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(3): 681-686
- [9] Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, et al. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor [J]. *Nat Med*, 2002, 8(4): 349-357
- [10] Zhang SX, Wang JJ, Gao G, et al. Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy [J]. *J Mol Endocrinol*, 2006, 37(1): 1-12
- [11] Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T, et al. Pigment epithelium-derived factor inhibits advanced glycation end product-induced retinal vascular hyperpermeability by blocking reactive oxygen species-mediated vascular endothelial growth factor expression [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(29): 20213-20220
- [12] Kim SR, Lee KS, Park SJ, et al. Inhibition of p38 MAPK reduces expression of vascular endothelial growth factor in allergic airway disease [J]. *J Clin Immunol*, 2012, 32(3): 574-586
- [13] Weidemann A, Johnson RS. Biology of HIF-1 α [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(4): 621-627
- [14] Zapata-Morales JR, Galicia-Cruz OG, Franco M, et al. HIF-1 α diminishes SGLT1 and SGLT2 expression in renal epithelial tubular cells (LLC-PK1) under hypoxia [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(1): 346-357
- [15] De Francesco EM, Lappano R, Santolla MF, et al. HIF-1 α /GPER signaling mediates the expression of VEGF induced by hypoxia in breast cancer associated fibroblasts (CAFs) [J]. *Breast Cancer Res*, 2013, 15(4): R64
- [16] Xu Z, Fang S, Zuo Y, et al. Combination of pigment epithelium-derived factor with radiotherapy enhances the antitumor effects on nasopharyngeal carcinoma by down-regulating vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis [J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(10): 1789-1798