

## HRD1 在 oxLDL 刺激的人脐静脉血管内皮细胞中的表达及意义

玄文颖<sup>1</sup>,李红妍<sup>1,2</sup>,杨 珣<sup>1</sup>,王 峰<sup>1,2</sup>,李庆国<sup>3</sup>,苏东明<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学病理学系,江苏 南京 210029;<sup>2</sup>南京医科大学附属逸夫医院检验病理中心,江苏 南京 211166;<sup>3</sup>南京医科大学第二附属医院心脏外科,江苏 南京 210011)

**[摘要]** 目的:观察羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶降解蛋白 1(HMG-CoA reductase degradation protein 1,HRD1)在人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVEC)内的表达情况,探讨 HRD1 对氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein,oxLDL)引起的血管内皮细胞凋亡及细胞内脂质沉积的影响。方法:免疫荧光检测 HRD1 在动脉粥样硬化患者血管组织中的表达。同时体外传代培养 HUVEC,oxLDL 刺激细胞后 Western blot 法观察 HRD1 的表达情况。Ad-HRD1 感染 oxLDL 刺激后的 HUVEC,Western blot 法观察 HRD1 对细胞凋亡的影响,油红 O 染色法观察 HRD1 对细胞内脂滴生成的影响。结果:HRD1 表达于动脉粥样硬化患者血管组织中;也表达于 oxLDL 刺激后的 HUVEC 中;Ad-HRD1 感染 oxLDL 刺激后的 HUVEC,Cleaved PARP 和 Cleaved Caspase 3 表达降低并且细胞内脂滴形成减少。结论:HRD1 可抑制 oxLDL 导致的内皮细胞凋亡和细胞内脂质沉积。

**[关键词]** HRD1;oxLDL;血管内皮细胞;细胞凋亡;脂质沉积

**[中图分类号]** R329.28

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)05-559-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20160510

## Expression of HRD-1 on umbilical vein endothelial cells stimulating from oxLDL and related clinical importance

Xuan Wenying<sup>1</sup>,Li Hongyan<sup>1,2</sup>,Yang Xun<sup>1</sup>,Wang Feng<sup>1,2</sup>,Li Qingguo<sup>3</sup>,Su Dongming<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Pathology,NJMU,Nanjing 210029;<sup>2</sup>Center of Clinical Laboratory and Pathology,Affiliated Yifu Hospital of NJMU,Nanjing 211166;<sup>3</sup>Department of Cardiovascular Surgery,2nd Affiliated Hospital of NJMU,Nanjing 210011,China)

**[Abstract]** **Objective:**To explore the role of HRD1 in apoptosis and lipid deposition caused by oxLDL in human umbilical vein endothelial cells(HUVECs). **Methods:**HUVECs were incubated with 0 μg/ml oxLDL as control group,or with 50 μg/ml oxLDL as oxLDL group. Western blot was used to analyze expression of HRD1 protein. HRD1 expression in vascular tissue was detected by immunofluorescence analysis. HRD1 effects on cell apoptosis and lipids deposition of HUVEC was detected by western blot and oil red o staining analysis. **Results:**Expression of HRD1 protein decreased significantly in oxLDL group than that in control group. Meanwhile,HRD1 also expressed in the atherosclerotic plaques,and predominantly in the endothelial cells. oxLDL induced the significant increases in apoptosis and lipids deposition of HUVEC. While the HRD1 overexpression by the infection of Ad-HRD1 markedly inhibited the Cleaved PARP and Cleaved Caspase 3 expression and lipids deposition caused by oxLDL. **Conclusion:**HRD1 inhibited the apoptosis and lipids deposition of HUVEC induced by oxLDL.

**[Key words]** HRD1;oxLDL; endothelial cell; apoptosis;lipids deposition

[Acta Univ Med Nanjing,2016,36(05):559-563]

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(面上项目,重点项目,重大项目)(81171589)

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

动脉粥样硬化是一种常见的动脉硬化性血管疾病,主要累及大中型动脉,正常动脉血管壁分为内膜、中膜、外膜 3 层,在内膜表面有一层连续光滑的内皮细胞。但在动脉粥样硬化的起始阶段常有血管内皮细胞的损伤剥脱,内膜通透性改变,进而引起细胞凋亡和细胞内脂质沉积<sup>[1]</sup>。近年来研究表明氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)刺激内皮细胞导致细胞凋亡和细胞内脂质沉积,加速了动脉粥样硬化血管内皮细胞功能障碍<sup>[2]</sup>。HRD1 是定位于内质网的一种 E3 泛素化连接酶,最初发现于酵母菌中,它通过对错误折叠的蛋白质进行降解,参与了内质网蛋白的质量控制<sup>[3]</sup>。而已知的许多疾病都与内质网功能紊乱和蛋白质错误折叠有关,已有文献报道 HRD1 在乳腺癌<sup>[4]</sup>、神经退行性疾病中起关键性作用<sup>[5]</sup>。但是关于 HRD1 在人脐静脉血管内皮细胞和动脉粥样硬化中的作用鲜有相关文献报道,为此本实验通过体外培养 HUVEC,并在 oxLDL 刺激细胞的情况下,使用过表达 HRD1 腺病毒感染细胞,检测凋亡基因 Cleaved PARP 和 Cleaved Caspase 3 的表达水平和细胞内脂滴的形成量,探讨 HRD1 是否会影响 oxLDL 引起的细胞凋亡和细胞内脂质沉积,为动脉粥样硬化的治疗提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

6 例动脉粥样硬化患者血管组织切片(南京医科大学第二附属医院心脏外科)。人脐静脉血管内皮细胞 HUVEC(ATCC,美国)。oxLDL(广州奕源生物科技有限公司),兔抗人 HRD1 抗体(Abcam 公司,美国),兔抗人 Cleaved PARP 抗体、兔抗人 Cleaved Caspase 3 抗体(CST 公司,美国),油红 O 试剂盒(南京建成公司),DMEM 培养基(HyClone 公司,美国),胎牛血清(BI 公司,以色列),胰蛋白酶(Gibco 公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

人脐静脉血管内皮细胞 HUVEC 用含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养,在细胞感染 Ad-HRD1 时用不含胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养。将细胞置于含 5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 37℃细胞培养箱中培养。

#### 1.2.2 腺病毒瞬时感染细胞

将 HUVEC 传代至第 4 代后将细胞分为 3 组,待其生长至约 80%融合时,给予相应处理:第一组

(对照组 PBS+Ad-Control),第二组(oxLDL 刺激+Ad-Control),第三组(oxLDL 刺激+Ad-HRD1)。第一组和第二组在不含胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中加入 Ad-Control,第三组在不含胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中加入 Ad-HRD1,5 h 后更换含有 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,之后在第二组和第三组中加入 oxLDL (50 μg/mL),第一组中加入与 oxLDL 等量的 PBS,继续培养至 48 h 后提取细胞蛋白,通过 Western blot 实验对凋亡基因进行检测。

#### 1.2.3 细胞油红 O 染色

HUVEC 传代至第 6 代,将细胞分为 3 组:第一组(对照组 PBS+Ad-Control)、第二组(oxLDL 刺激+Ad-Control)、第三组(oxLDL 刺激+Ad-HRD1)持续培养 48 h 后终止培养,用油红 O 染色试剂盒对细胞内脂质沉积进行检测,严格按照试剂盒说明书操作。

#### 1.2.4 Western blot 检测蛋白表达

提取总蛋白,BCA(bicinchoninic acid)法测定蛋白浓度,蛋白变性后上样量为 40 μg,10%、12%聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,3%脱脂奶粉封闭,4℃过夜孵育一抗(兔抗人 HRD1,稀释度 1:1 000;兔抗人 PARP,稀释度 1:1 000;兔抗人 Caspase 3,稀释度 1:1 000;内参 Tublin 稀释度 1:2 500),二抗(羊抗兔,稀释度 1:8 000,羊抗鼠,稀释度 1:8 000),室温孵育 1 h。ECL 显影曝光。用 Image J 软件对条带面积和灰度值进行分析。表达水平为目的条带与内参条带面积的比值。

#### 1.2.5 免疫组织荧光染色

将石蜡切片 65℃烤片 2 h 至石蜡融化后,二甲苯,梯度乙醇脱蜡后蒸馏水冲洗切片 3 次,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭灭活内源性过氧化物酶 10 min 后抗原修复,3% BSA 室温封闭 1 h,HRD1、PECAM-1 抗体 4℃孵育过夜,PBS 洗涤 3 次,37℃二抗孵育 50~60 min, PBS 洗涤 3 次,染细胞核 2 min,封片剂封片,显微镜下观察。

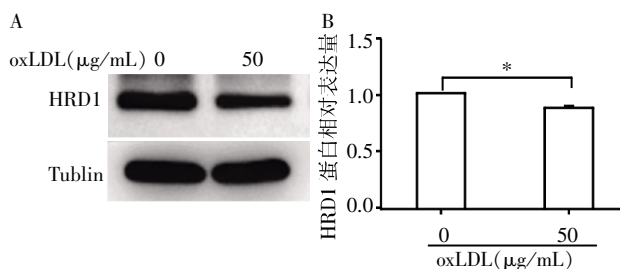
### 1.3 统计学方法

所有数据均采用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用双侧 Student's *t* 检验和方差分析。所有结果均采用 GraphPad InStat 3 及 SPSS20.0 统计软件进行统计。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HRD1 在 HUVEC 中的表达

以 Western blot 的方法检测 HRD1 蛋白在 HUVEC 中的表达情况。如图 1 所示,HRD1 在 HUVEC



A: 在 HUVEC 中加入 oxLDL 刺激后 HRD1 表达水平降低;B:A 中结果的分析图,\* $P < 0.05(n \geq 3)$ 。

图 1 HRD1 在 HUVEC 中的表达

Figure 1 Expression of HRD1 protein in HUVEC

中有基础表达;而在 oxLDL (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激 HUVEC 24 h 后,HRD1 的表达则被明显抑制 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 HRD1 在动脉粥样硬化斑块中的表达

为了阐明血管内皮细胞中 HRD1 在动脉粥样硬化斑块中的表达情况,以 PECAM-1 抗体标记斑块中的血管内皮细胞,通过免疫组织荧光染色发现,在动脉粥样硬化斑块部位 HRD1 有表达,并且主要表达于靠近血管腔的血管内皮细胞部位(图 2)。

### 2.3 HRD1 对 oxLDL 诱导 HUVEC 凋亡的抑制作用

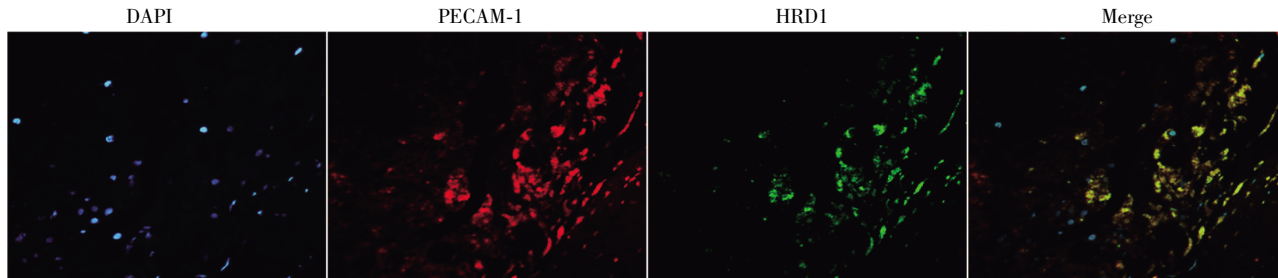
为了观察 Ad-HRD1 对 oxLDL 刺激后的 HUVEC 细胞凋亡是否有影响,以 Western blot 的方法检测细胞凋亡相关基因 Cleaved PARP 和 Cleaved Caspase 3 蛋白的表达。与对照组相比,oxLDL (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激 24 h 可显著上调促凋亡基因 Cleaved PARP 和 Cleaved Caspase 3 的表达;而过表达 HRD1 则可显著抑制由 oxLDL 刺激造成的 Cleaved PARP 和 Cleaved Caspase 3 的表达(图 3)。

### 2.4 HRD1 对 HUVEC 脂质沉积的影响

已知 oxLDL 可以通过内皮细胞表面的受体内吞进入细胞进而造成细胞内脂质沉积。与对照组相比,oxLDL (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 刺激 24 h 可显著增加脂质在血管内皮细胞 HUVEC 的沉积;而过表达 HRD1 则可显著抑制由 oxLDL 刺激造成的脂质沉积(图 4)。

## 3 讨论

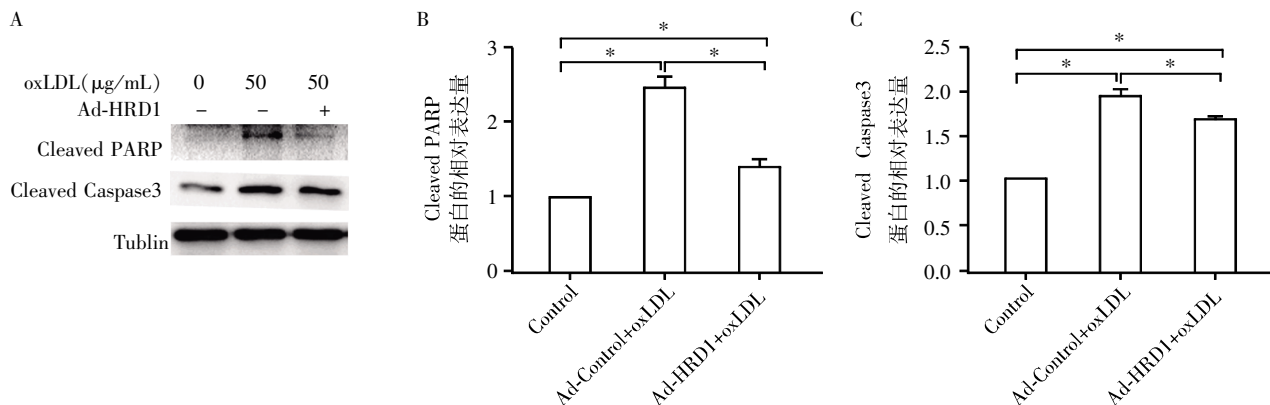
动脉粥样硬化血管病变的机制研究尚未完全被阐明,但内皮细胞功能紊乱在动脉粥样硬化斑块形成早期发挥了重要作用<sup>[1]</sup>。内皮细胞凋亡作为动脉粥样硬化的起始因素诱导了动脉粥样硬化的发



荧光显微镜下观察,动脉粥样硬化斑块中,内皮细胞黏附分子(PECAM-1)(内皮细胞,红色),HRD1(绿色),内皮细胞核(蓝色)。

图 2 HRD1 在动脉粥样硬化斑块中的表达情况( $\times 200$ )

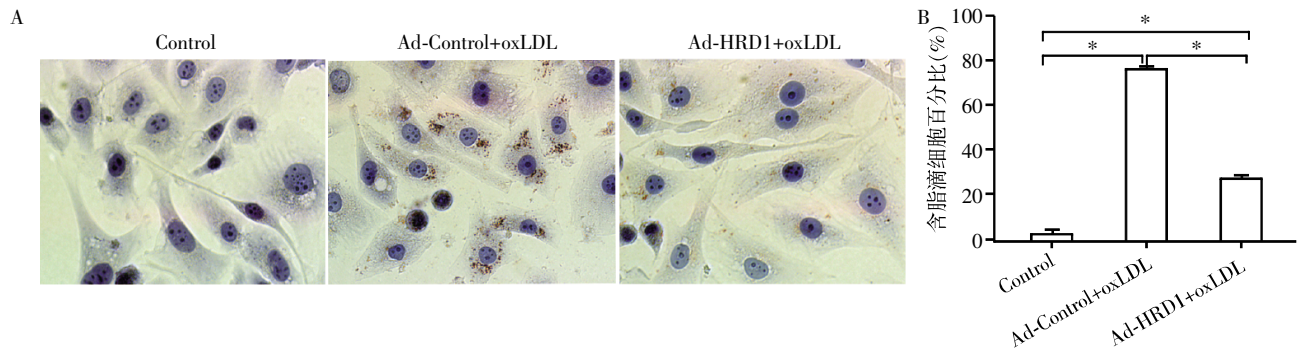
Figure 2 Expression of HRD1 in atherosclerotic plaques( $\times 200$ )



A: 在 HUVEC 中加入 oxLDL 刺激和 oxLDL 刺激且同时感染 Ad-HRD1 后 Cleaved PARP 和 Cleaved Caspase 3 的表达情况;B,C: A 中结果的分析图,\* $P < 0.05(n \geq 3)$ 。

图 3 HRD1 对 HUVEC 凋亡的影响

Figure 3 The effect of HRD1 on apoptosis of HUVEC



A:油红 O 染色观察 oxLDL 刺激后 HUVEC 中脂滴含量和 oxLDL 刺激且感染了 Ad-HRD1 后 HUVEC 中脂滴含量;B:A 中结果的分析图, \* $P < 0.05(n \geq 3)$ 。

图 4 HRD1 对 HUVEC 脂质沉积的影响

Figure 4 The effect of HRD1 on lipid deposition of HUVEC

病和斑块的形成<sup>[6-7]</sup>。多种原因会造成内皮细胞凋亡,例如,高葡萄糖水平通过产生各种细胞因子调节细胞功能障碍和代谢紊乱,进而导致内皮细胞凋亡<sup>[8]</sup>。尿酸可能通过激活氧化应激和内质网应激,引起内皮细胞功能障碍,进而导致脐静脉血管内皮细胞凋亡<sup>[9]</sup>。因此通过保护内皮细胞不受损伤,进而阻止疾病的发生发展成为了近年来研究的热点。以往研究发现多甘烷醇可能通过减轻内膜损伤,影响脂质沉积及平滑肌增殖,进而抑制动脉粥样硬化发展<sup>[10]</sup>。另有研究表明低浓度胰岛素可通过小窝蛋白-1 抑制高糖导致的内皮细胞凋亡<sup>[11]</sup>。

oxLDL 作为动脉粥样硬化发病的一个危险因素,近年来发现它与内皮细胞功能紊乱密切相关,包括增加内皮细胞凋亡和细胞内脂质沉积<sup>[12-13]</sup>。因此阻止 oxLDL 对内皮细胞凋亡和脂质沉积造成的损害为动脉粥样硬化的预防和治疗提供了一个新的治疗手段。

HRD1 作为一种 E3 泛素连接酶,参与了很多疾病的发生发展机制<sup>[14-15]</sup>。以往人们对于 HRD1 的研究除了涉及它在内质网相关蛋白的降解和肿瘤等方面的作用,同时也涉及了它在自身免疫性疾病和肝硬化中的作用<sup>[16-17]</sup>。体外细胞实验中的研究发现,HRD1 作为一种抗凋亡分子能够保护内质网应激诱导的细胞凋亡<sup>[18]</sup>。近年来研究发现,HRD1 高表达于 AdV-ATF6 感染后的心肌细胞中,并且在加入了内质网应激诱导剂 TM、TG、DTT 后 HRD1 的 mRNA 表达水平增高,基因沉默 HRD1 后心肌细胞的生存率降低,细胞凋亡增多,而在过表达 HRD1 之后心肌细胞的生存率明显升高<sup>[3]</sup>。

本实验中使用了人脐静脉血管内皮细胞这种与人类心血管系统高相关性的细胞作为体外模型,探讨 HRD1 对 oxLDL 诱导的细胞凋亡和细胞内脂

质沉积的保护作用。本实验的结果显示 oxLDL 产生内皮细胞凋亡的效应是通过选择性上调促凋亡基因实现的,而 HRD1 使这种效应被阻碍了。并且结果显示 HRD1 阻碍了过多的 oxLDL 内吞进入细胞。本实验也首次研究了 HRD1 在 oxLDL 诱导的内皮细胞凋亡和脂质沉积中的作用。并且也是首次发现 HRD1 表达于动脉粥样硬化血管组织中,这些结果都为 HRD1 日后用于临床预防和治疗动脉粥样硬化提供了理论和现实基础。但本实验中结果显示,在 oxLDL 刺激 HUVEC 后,HRD1 在细胞中的蛋白表达水平低于未刺激的对照组,这提示了 oxLDL 可能会对 HRD1 起到抑制作用,或者 HRD1 通过内质网相关蛋白的降解途径参与了某种蛋白质的降解过程,进而降低了自身的表达水平。HRD1 对 oxLDL 诱导的内皮细胞凋亡和脂质沉积进行保护的机制还没有阐明,今后将对以上这些内容进行更加深入的探讨和研究。

#### [参考文献]

- [1] Libby P. Inflammation in atherosclerosis [J]. *Nature*, 2002, 420(6917): 868-874
- [2] Ahsan A, Han G, Pan J, et al. Phosphocreatine protects endothelial cells from oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis by modulating the PI3K/Akt/eNOS pathway [J]. *Apoptosis*, 2015, 20(12): 1563-1576
- [3] Doroudgar S, Volkens M, Thuerauf DJ, et al. Hrd1 and ER-Associated protein degradation, ERAD, are critical elements of the adaptive ER stress response in cardiac myocytes [J]. *Circ Res*, 2015, 117(6): 536-546
- [4] Xu YM, Wang HJ, Chen F, et al. HRD1 suppresses the growth and metastasis of breast cancer cells by promoting IGF-1R degradation [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(40): 42854-42867
- [5] Omura T, Kaneko M, Okuma Y, et al. Endoplasmic retic-

- ulum stress and Parkinson's disease; the role of HRD1 in averting apoptosis in neurodegenerative disease[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013: 239854
- [6] Durand E, Scoazec A, Lafont A, et al. In vivo induction of endothelial apoptosis leads to vessel thrombosis and endothelial denudation; a clue to the understanding of the mechanisms of thrombotic plaque erosion[J]. *Circulation*, 2004, 109(21): 2503-2506
- [7] Wang N, Han Y, Tao J, et al. Overexpression of CREG attenuates atherosclerotic endothelium apoptosis via VEGF/PI3K/AKT pathway [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 218(2): 543-551
- [8] Yu M, Lu G, Zhu X, et al. Downregulation of VEGF and upregulation of TL1A expression induce HUVEC apoptosis in response to high glucose stimuli[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(4): 3265-3272
- [9] Li P, Zhang L, Zhang M, et al. Uric acid enhances PKC-dependent eNOS phosphorylation and mediates cellular ER stress: A mechanism for uric acid-induced endothelial dysfunction[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(4): 989-997
- [10] 李晶晶, 田乃亮, 朱中生, 等. 多甘烷醇抗动脉粥样硬化的分子机制研究[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2012, 32(5): 650-654
- [11] 张 慧, 陈向芳, 叶福林. 胰岛素对高糖条件下人脐静脉内皮细胞凋亡及小窝蛋白-1 表达的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2014, 34(10): 1337-1341
- [12] Chang HC, Chen TG, Tai YT, et al. Resveratrol attenuates oxidized LDL-evoked Lox-1 signaling and consequently protects against apoptotic insults to cerebrovascular endothelial cells[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31(3): 842-854
- [13] Mitra S, Deshmukh A, Sachdeva R, et al. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy[J]. *Am J Med Sci*, 2011, 342(2): 135-142
- [14] Kaneko M, Ishiguro M, Niinuma Y, et al. Human HRD1 protects against ER stress-induced apoptosis through ER-associated degradation[J]. *FEBS Lett*, 2002, 532(1-2): 147-152
- [15] Kikkert M, Doolman R, Dai M, et al. Human HRD1 is an E3 ubiquitin ligase involved in degradation of proteins from the endoplasmic reticulum[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(5): 3525-3534
- [16] Yang H, Qiu Q, Gao B, et al. Hrd1-mediated BLIMP-1 ubiquitination promotes dendritic cell MHCII expression for CD4 T cell priming during inflammation[J]. *J Exp Med*, 2014, 211(12): 2467-2479
- [17] Hasegawa D, Fujii R, Yagishita N, et al. E3 ubiquitin ligase synoviolin is involved in liver fibrogenesis[J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13590
- [18] Amano T, Yamasaki S, Yagishita N, et al. Synoviolin/Hrd1, an E3 ubiquitin ligase, as a novel pathogenic factor for arthropathy[J]. *Genes Dev*, 2003, 17(19): 2436-2449

[收稿日期] 2016-02-03

热烈祝贺《南京医科大学(自然科学版)》编辑部  
荣获第四届江苏省科技期刊“金马奖”优秀团队奖！