·论　　著·

血管内皮生长因子对PC12细胞缺氧损伤凋亡的保护作用

莫世静

[摘要] **目的** 观察血管内皮生长因子(VEGF)对氯化钴诱导的PC12细胞缺氧损伤及凋亡的影响并探讨其作用机制。**方法** 应用MTT及Hoechst/PI染色检测VEGF对氯化钴诱导的细胞存活力下降及凋亡的影响。采用RT-PCR和Western-blotting检测XIAP及核转录因子κB(NF-κB)信号蛋白表达情况。采用分光光度法检测Caspase-3活性。**结果** MTT结果显示0.6 mmol/L和0.8 mmol/L氯化钴处理PC 12细胞24 h后,VEGF+氯化钴组的细胞活性明显高于氯化钴组,差异有统计学意义(t分别=8.53、5.70,P均<0.05),在0.6 mmol/L氯化钴处理后24 h和48 h,VEGF+氯化钴处理组的细胞活性明显高于氯化钴组,差异有统计学意义(t分别=8.85、7.43,P均<0.05)。RT-PCR和Western-blotting显示氯化钴处理组PC12细胞XIAP mRNA表达水平明显较未给予氯化钴处理的VEGF组下降(t=4.83,P<0.05),而VEGF+氯化钴处理组PC12细胞经氯化钴处理24 h后XIAP mRNA表达水平较氯化钴组明显上升(t=5.71,P<0.05)。VEGF处理可使IκBα蛋白去磷酸化与去泛素化,P65蛋白入核。VEGF+氯化钴处理组的Caspase-3活性比氯化钴处理组明显增加,差异有统计学意义(t=4.81,P<0.05),而VEGF+氯化钴+BAY 11-7085组Caspase-3活性较VEGF+氯化钴处理组明显下降,差异有统计学意义(t=8.17,P<0.05)。Hochest/PI荧光染色显示氯化钴+VEGF组PI阳性细胞较氯化钴组明显减少,而氯化钴+VEGF+BAY11-7085组的PI阳性细胞较氯化钴+VEGF组明显增加。**结论** VEGF处理能抑制氯化钴诱导的PC12细胞凋亡,其细胞保护作用的机制可能与其激活NF-κB信号有关。

[关键词] 血管内皮生长因子; 缺氧; PC12细胞; 凋亡; 氯化钴

Vascular endothelial growth factor prevents the injury and apoptosis of PC12 cells induced by hypoxia through activation of NF-kappaB signaling

MO Shijing. Department of Critical Care Medicine, Zhejiang Provincial People's Hospital, People's Hospital of Hangzhou Medical College, Hangzhou 310014, China

[Abstract] Objective To investigate the effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) on cobalt chloride ($CoCl_2$)-induced PC12 cells apoptosis and the underlying mechanisms. **Methods** The viability and apoptosis of PC12 cells were measured by MTT assay and Hoechst/PI staining. The expression of XIAP and NF-kappaB signlaing proteins was measured by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting. Caspase-3 assasy kit was used to detect the activity of Caspase-3. **Results** MTT showed that the cell viability of PC12 cells treated with 0.6 mmol/L or 0.8mmol/L $CoCl_2$ was decreased, while VEGF treatment significantly blocked this (t=8.53, 5.70, P<0.05). The viability of cells with the treatment of VEGF combined with 0.6 mmol/L $CoCl_2$ were higher than those of cells treated with 0.6 mmol/L $CoCl_2$ (t=8.85, 7.43, P<0.05). RT-PCR and western blotting results showed that the expression of XIAP mRNA of PC12 cells in VEGF group was repressed after dealing with 0.6 mmol/L $CoCl_2$ treatment (t=4.83, P<0.05), while the expression of XIAP mRNA of PC12 cells in the treatment group of VEGF combined with $CoCl_2$ was significantly higher than that in the treatment group of $CoCl_2$ (t=5.71, P<0.05). VEGF treatment could induce phosphorylation and ubiquitination of IκBα as well as nuclear localization of P65. The activity of Caspase-3 in the treatment group of VEGF + $CoCl_2$ was significantly higher than that in the treatment group of $CoCl_2$ (t=4.81, P<0.05). The activity of Caspase-3 in the treatment group of VEGF + $CoCl_2$ + BAY 11-7085 was significantly lower than that in the treatment group of VEGF + $CoCl_2$ (t=8.17, P<0.05). Hoechst / PI staining demonstrated that VEGF significantly inhibited the PI-positive staining of PC12 cells that increased by $CoCl_2$, but BAY 11-7085 attenuated the effects of

DOI:10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2018.05.004

基金项目:浙江省自然基金项目(2017LY17H15000)

作者单位:310014 浙江杭州,浙江省人民医院、杭州医学院附属人民医院重症医学科

VEGF. **Conclusion** VEGF treatment can inhibit the apoptosis of PC12 cells induced by $CoCl_2$, the mechanism of which may be related to the activation of NF-kappaB signal.

[Key words] VEGF; hypoxia; PC12 cells; apoptosis; $CoCl_2$

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是血管内皮细胞特异性的肝素结合生长因子,具有体内诱导血管新生并有效促进血管再生的特性,因此被广泛应用于脊髓损伤、缺血性脑卒中及缺血缺氧性损伤的治疗及修复。大量研究表明,在缺氧损伤局部微环境下,VEGF能改善神经功能从而促进损伤修复[1,2]。然而,其中的机制尚不清楚。NF-κB信号通路是由两个Rel蛋白单体组成的二聚物转录因子,它能够调控一系列参与细胞生理活动的基因,进而影响免疫、炎症、应激及细胞凋亡等生理活动。本次研究在前期研究的基础上,应用体外氯化钴缺氧损伤的细胞模型,探讨VEGF对氯化钴诱导的神经元样PC12细胞凋亡的保护作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂 重组VEGF由R&D System生产。DMEM高糖培养基由美国Gibco公司生产,Hoechst/PI由美国Sigma公司生产。PC12细胞购自美国模式培养物保藏所,BAY 1-7085由美国Cayman Chemical生物技术公司生产。本次实验时间为2017年6月。

1.2 方法

1.2.1 MTT检测细胞存活率 将PC12细胞以5×10^4/ml的浓度,接种于96孔板,50 μl/孔。分为以下两组处理:①氯化钴组:分别予以0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.3 mmol/L、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L和0.8 mmol/L氯化钴处理;②VEGF+氯化钴处理组:100 ng/ml VEGF预培养2 h后,予0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.3 mmol/L、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L和0.8 mmol/L氯化钴处理。每组做3个平行复孔。处理完毕后,每孔加5 mg/ml MTT 20 μl,继续培养4 h,吸出培养液,加150 μl二甲基亚砜,待其完全溶解后,用酶联免疫仪在波长490 nm处读取吸光度值,计算两组不同浓度氯化钴下的细胞存活率。并且分别在0.6 mmol/L氯化钴处理后6 h、12 h、24 h、48 h计算两组细胞存活率。实验重复3次。

细胞存活率=(实验孔吸光度值/对照孔吸光度值)×100%。

1.2.2 实时定量PCR检测XIAP PC12细胞分为三组进行以下处理:①100 ng/ml VEGF处理组;②0.6 mmol/L氯化钴处理24 h组;③VEGF+氯化钴处理组:采用100 ng/ml VEGF预培养2 h后予以0.6 mmol/L氯化钴处理24 h。处理完成后用实时定量PCR检测,提取PC12细胞总RNA,计算RNA的纯度。逆转录后,取cDNA做PCR,引物设计如下:GAPDH上游引物:5-AATCCCATCACCATCTTCC-3;下游引物:5-TGGACTCCACGACGTACTC-3。XIAP上游引物:5-GACCCTCCCCTTGGAC -3;下游引物:5-CTGTTAAAAGTCATCTTCTCTTGAA-3。PCR反应条件为预变性94 ℃ 5 min,变性94 ℃ 30 s,退火60 ℃ 30 s,延伸72 ℃ 1min,最后延伸72 ℃ 10 min。反应结束检测XIAP mRNA表达。

1.2.3 Western blotting检测NF-kappaB信号蛋白表达 将PC12细胞接种于6孔板,分为以下三组进行处理:①100 ng/ml VEGF处理组;②0.6 mmol/L氯化钴处理24 h组;③VEGF+氯化钴处理组:采用100 ng/ml VEGF预培养2 h后予以0.6 mmol/L氯化钴处理24 h。处理完毕后,分别加入细胞裂解液,在4℃下裂解 30 min,取部分蛋白液采用二辛酸法进行蛋白定量。总蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转移到硝酸纤维素膜上。用5%胎牛血清封闭1 h,随后加入通路蛋白磷酸化及非磷酸化抗体(1∶500),用Tris-HCl缓冲盐溶液洗3次,每次10 min。增强化学发光法显色,用凝胶成像系统扫描分析P65磷酸化及表达情况。另外取蛋白液上清,加入1 μg抗IκBα抗体及10 μl protein A琼脂糖珠4℃缓慢摇晃孵育过夜;以3 000 r/min速度离心3 min,吸去上清,琼脂糖珠用1ml裂解缓冲液洗3次;加入15 μl的2×SDS上样缓冲液行Western blotting分析IκBα泛素化情况。实验重复3次。

1.2.4 分光光度法检测Capsase-3活性 将PC12细胞接种于96孔板,进行以下六组处理:①空白对照组:不进行任何处理,为阴性对照;②氯化钴组:予以0.6 mmol/L氯化钴处理;③VEGF+氯化钴处理组:采用100 ng/ml VEGF预培养2 h后予以0.6 mmol/L氯化钴处理;④BAY-117085组:在①的基础上加入

5 μmol/L BAY 11-7085；⑤氯化钴+ BAY 11-7085处理组：在②的基础上加入5 μmol/L BAY 11-7085；⑥VEGF+氯化钴+ BAY 11-7085处理组：在③的基础上加入5 μmol/L BAY 11-7085。每组设3个复孔处理完毕后，将六组细胞用胰酶消化，并收集至备用的细胞培养液中。在4℃、600 r/min离心5 min后收集细胞，小心吸除上清，同时确保尽量没有细胞被吸除，然后用磷酸盐缓冲液洗涤1次。吸尽上清后，加入100 μl裂解液，重悬沉淀，冰浴裂解15 min。加入Ac-DEVD-pNA（2 mmol/L）后混匀，注意避免在混匀时产生气泡。37 ℃孵育60～120 min。发现颜色变化比较明显时可测定吸光度值。实验重复3次。

1.2.5 Hochest/PI染色观察细胞凋亡 将PC 12细胞（4×10^4/孔）接种于6孔板，分为以下六组进行处理：①空白对照组：不进行任何处理，为阴性对照；②氯化钴组：予以0.6 mmol/L氯化钴处理；③VEGF+氯化钴处理组：采用100 ng/ml VEGF预培养2 h后予以0.6 mmol/L氯化钴处理；④BAY-117085组：在①的基础上加入5 μmol/L BAY 11-7085；⑤氯化钴+ BAY 11-7085处理组：在②的基础上加入5 μmol/L BAY 11-7085；⑥VEGF+氯化钴+ BAY 11-7085处理组：在③的基础上加入5 μmol/L BAY 11-7085。将六组细胞用4%多聚甲醛固定15 min，磷酸盐缓冲液洗3次，5 mg/L Hochest 33258染色液染色15 min，室温下磷酸盐缓冲液洗3次，PI染色15 min，在荧光显微镜观察VEGF对氯化钴诱导的PI阳性染色的影响。

1.3 统计学方法 采用SPSS 17.0统计软件进行分析。计量数据以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较行t检验。设$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGF处理对氯化钴引起的PC12细胞活性的影响见图1

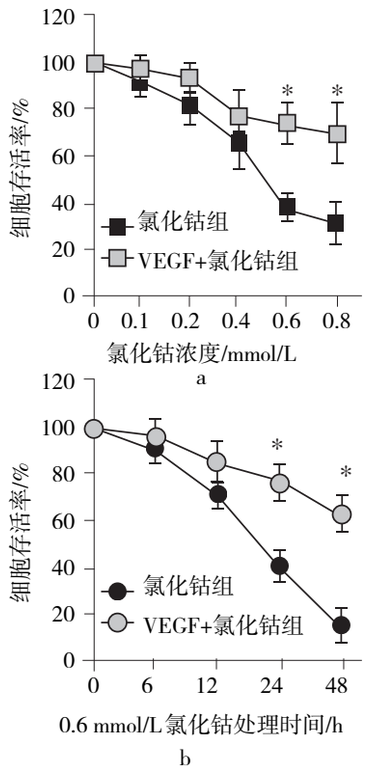


图1 VEGF对氯化钴诱导的PC12细胞活性的影响

注：a：不同浓度氯化钴处理PC12细胞24 h后的细胞存活率；b：0.6 mmol/L 氯化钴处理后不同时间PC12细胞存活率。

由图1a可见，采用0.6 mmol/L和0.8 mmol/L氯化钴处理PC12细胞24 h后，VEGF+氯化钴组的细胞活性明显高于氯化钴组，差异有统计学意义（t分别=8.53、5.70，P均<0.05）。0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.4 mmol/L氯化钴处理PC12细胞24 h后，两组的细胞存活率比较，差异无统计学意义（t分别=3.21、3.44、2.64，P均>0.05）。由图1b可见，在0.6 mmol/L氯化钴处理后24 h和48 h，VEGF+氯化钴组的细胞活性明显高于氯化钴组（t分别=8.85、7.43，P均<0.05）。

2.2 VEGF对PC12细胞的NF-κB信号蛋白表达的影响见图2

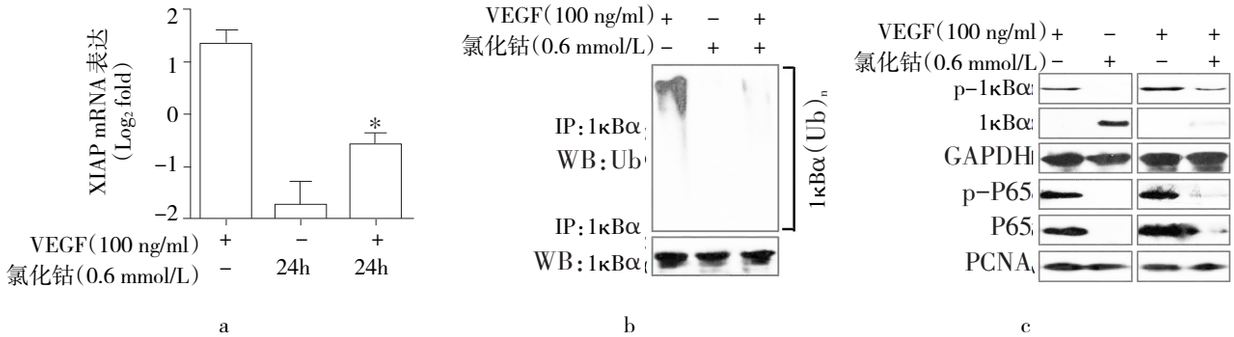


图2 VEGF对PC12细胞的NF-κB信号表达的影响

由图2a可见，氯化钴组PC12细胞XIAP mRNA表达水平明显较VEGF+氯化钴处理组下降（t=4.83，P<0.05），而VEGF+氯化钴处理组PC12细胞经氯化钴处理24 h后XIAP mRNA表达水平较氯化钴处理组明显上升（t=5.71，P<0.05）。由图2b、2c可见，VEGF处理可使IκBα蛋白去磷酸化与去泛素化，P65蛋白出核。

2.3　BAY 1-7085对VEGF介导的PC12细胞保护作用的影响见图3、封3图4

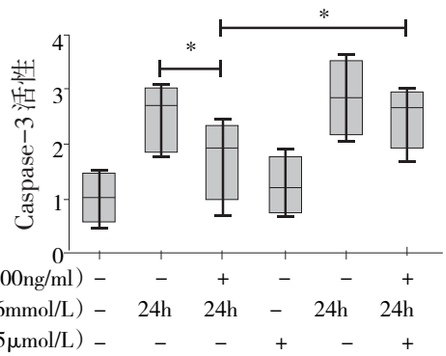


图3　BAY 11-7085对VEGF介导的PC12细胞Caspase-3活性的影响

由图3可见，PC12细胞经0.6 mmol/L 氯化钴处理24 h，可观察到Caspase-3的活性明显增强，与空白组比较，差异有统计学意义（t=8.75，P<0.05）。VEGF处理可以有效抑制氯化钴引起的Caspase-3的活性增加，与氯化钴处理组相比，差异有统计学意义（t=4.81，P<0.05）。BAY 11-7085可以明显阻断VEGF介导的Caspase-3活性下降，与VEGF+氯化钴处理组相比，差异有统计学意义（t=8.17，P<0.05）。

由封三图4可见，Hochest/PI荧光染色显示空白组和空白+BAY11-7085组PC12细胞染色质分布均匀，几乎不含PI阳性染色细胞；而氯化钴组和氯化钴+BAY11-7085组细胞核呈浓缩致密的固缩形态或颗粒状荧光，PI阳性细胞明显增加；氯化钴+VEGF组PI阳性细胞较氯化钴组明显减少，而氯化钴+VEGF+BAY11-7085组的PI阳性细胞较氯化钴+VEGF组明显增加。

3　讨论

缺血性卒中又名脑梗死，包括脑血栓形成、腔隙性梗死和脑栓塞等，约占全部脑卒中的70%，是由于脑组织局部供血动脉血流的突然减少或停止，造成该血管供血区的脑组织缺血、缺氧导致脑组织坏死、软化，并伴有相应部位的临床症状和体征，如偏瘫、失语等神经功能缺失的症候[3]。其病理生理过程可分为以脑动脉粥样硬化斑块形成过程为主的脑动脉病变期和脑动脉内血栓形成伴有脑组织缺血坏死的脑组织损伤期。脑组织损伤主要包括损伤局部神经元、胶质细胞及血管等支持结构的破坏以及随后发生的如缺血、缺氧、自由基产生及神经元凋亡[4]。大量实验证实脑损伤是引起大脑功能丧失的主要原因。因此，恢复缺血脑组织的供血供氧，促进神经功能修复成为缺血性脑卒中治疗的首要目标。

VEGF是一类35-44kD分子量大小，高度保守的同源二聚体糖蛋白。由于mRNA不同的剪切方式，产生出VEGF121/145/165/185/206等至少5种蛋白形式，其中VEGF121/145/165是分泌型可溶性蛋白，能直接作用于血管内皮细胞促进血管内皮细胞增殖，增加血管通透性。VEGF作为一种生长因子，广泛参与促血管新生、细胞增殖、分化、抗炎及抗凋亡过程[5-9]。此外，研究表明VEGF广泛表达于包括肝、肾、心、肺及脑等组织，将其应用在损伤局部区域可促进缺血性脑卒的神经功能修复[10]。正常生理情况下，VEGF含量维持稳定，当受到缺氧性刺激时，VEGF表达增加。调控VEGF表达的主要元件为缺氧诱导因子。当受到内外源性缺氧信号刺激时，缺氧诱导因子-1α去羟基化，在细胞核内结合VEGF基因启动子上的缺氧反应元件，从而增强VEGF的表达[11]。近年来有研究表明VEGF可通过与其受体VEGFR结合激活下游PI3K激酶、MAPK激酶、STAT3信号转导和转录活化蛋白等信号通路发挥作用[12]。更是有研究表明VEGF具有明显抑制细胞凋亡的功能。细胞凋亡过程中，多个信号传导通路及转录因子被激活。其中Caspase蛋白家族在细胞凋亡中起着不可替代的作用，在细胞凋亡启动时，116kD的PARP在Asp216-Gly217之间被Caspase-3剪切成31kD和85kD两个片段，使PARP中与DNA结合的两个锌指结构与羧基端的催化区域分离，不能发挥正常功能。结果使受PARP负调控影响的Ca/Mg依赖性核酸内切酶的活性增高，裂解核小体间的DNA，引起细胞凋亡[13,14]。NF-κB信号作为重要的炎症反应的通路分子，在细胞存活、凋亡及坏死的过程中扮演重要角色[15]。NF-κB通路激活主要泛素化IκBα导致其与P65解离，促进P65进入细胞核，结合XIAP基因启动子，增强其转录实现。

本次研究观察了VEGF处理对氯化钴引起的

PC12细胞活性下降的影响，结果显示0.6 mmol/L 氯化钴处理明显降低PC12细胞的活性，而VEGF处理可有效抑制氯化钴引起的PC12细胞活性下降。同时，本次研究还观察了0.6 mmol/L 氯化钴诱导的PC12细胞的XIAP mRNA与NF-κB蛋白表达情况，结果显示PC12细胞经0.6 mmol/L 氯化钴刺激后，XIAP mRNA表达水平明显下降、IκBα蛋白磷酸化与泛素化，P65蛋白核转位明显受抑，而VEGF处理可有效拮抗这一效应。此外，Caspase-3与Hoechst/PI染色结果表明VEGF处理减少了氯化钴诱导的PC12细胞凋亡，而这一抗凋亡作用可被BAY 11-7085阻断，提示VEGF介导的细胞保护作用与其激活NF-kappaB信号有关。

综上所述，VEGF处理能有效抑制低氧模拟剂氯化钴诱导的PC12细胞损伤，而NF-κB信号可能是介导这一作用的关键通路。这为VEGF应用于中枢神经系统损伤修复的治疗提供了新的实验依据。

参考文献

1 Shim JW, Madsen JR. VEGF signaling in neurological disorders [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(1): 275.

2 Nathaniel TI, Soyinka JO, Adedeji A, et al. Molecular and physiological factors of neuroprotection in hypoxia-tolerant models: pharmacological clues for the treatment of stroke[J]. J Exp Neurosci, 2015, 87(9): 1-5.

3 Jun-Long H, Yi L, Bao-Lian Z, et al. Necroptosis signaling pathways in stroke: from mechanisms to therapies[J]. Curr Neuropharmacol, 2018, [Epub ahead of print].

4 Lee RHC, Lee MHH, Wu CYC, et al. Cerebral ischemia and neuroregeneration[J]. Neural Regen Res, 2018, 13(3): 373-385.

5 Thieltges KM, Avramovic D, Piscitelli CL, et al. Characterization of a drug-targetable allosteric site regulating vascular endothelial growth factor signaling[J]. Angiogenesis 2018, [Epub ahead of print].

6 Shimizu A, Zankov DP, Kurokawa-Seo M, et al. Vascular endothelial growth factor-a exerts diverse cellular effects via small g proteins, rho and rap [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(4): 1203.

7 Luo J, Zhu C, Wang H, et al. MicroRNA-126 affects ovarian cancer cell differentiation and invasion by modulating expression of vascular endothelial growth factor [J]. Oncol Lett, 2018, 15(4): 5803-5808.

8 Zhang Q, Fang W, Ma L, et al. VEGF levels in plasma in relation to metabolic control, inflammation, and microvascular complications in type-2 diabetes: A cohort study [J]. Medicine, 2018, 97(15): e0415.

9 Luo X, Gu S, Zhang Y, et al. Kinsenoside ameliorates oxidative stress-induced rpe cell apoptosis and inhibits angiogenesis via erk/p38/nf-κb/vegf signaling[J]. Front Pharmacol, 2018, 20(9): 240.

10 Zupanc HRH, Alexander PG, Tuan RS. Neurotrophic support by traumatized muscle-derived multipotent progenitor cells: role of endothelial cells and vascular endothelial growth factor-a[J]. Stem Cell Res Ther, 2017, 8(1): 226.

11 Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, et al. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation [J]. Cell, 2001, 107(1): 43-54.

12 Przybylski M. A review of the current research on the role of bFGF and VEGF in angiogenesis[J]. J Wound Care, 2009, 18 (12): 516-519.

13 Pereira WO, Amarante-Mendes GP. Apoptosis: a programme of cell death or cell disposal? [J]. Scand J Immunol, 2011, 73(5): 401-407.

14 Okubo S, Uto T, Goto A, et al. Berberine induces apoptotic cell death via activation of caspase-3 and -8 in hl-60 human leukemia cells: nuclear localization and structure-activity relationships[J]. Am J Chin Med, 2017, 45 (7): 1497-1511.

15 Sun Z, Andersson R. NF-kappaB activation and inhibition: a review [J]. Shock, 2002, 18(2): 99-106.

（收稿日期 2018-04-20）

（本文编辑 蔡华波）