

## 高表达 *ALDH2* 基因改善血管内皮细胞功能的初步研究\*

胡秀英<sup>1</sup>, 方琴<sup>2\*\*</sup>, 王季石<sup>1</sup>, 马丹<sup>2</sup>, 蒋丽<sup>2</sup>

(1. 贵州医科大学附院 血液内科, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学附属白云医院 药剂科, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 探讨乙醛脱氢酶2 (ALDH2) 基因导入人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 后对其增殖和抗氧化损伤的影响。方法: 将培养的 HUVECs 分为转染目的基因组 (转基因组)、转染空载体组 (空质粒对照组) 和未转染质粒组 (阴性对照组), 转基因组采用脂质体介导的方法将含人 *ALDH2* 基因的真核表达载体导入 HUVECs 中, 采用 RT-PCR 和 Western blot 检测各组 *ALDH2* 基因和蛋白的表达; 采用不同浓度过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) (0、50、75、100 和 125  $\mu\text{mol/L}$ ) 孵育 HUVECs 48 h 后, 检测各组细胞增殖水平及氧化损伤程度, 检测各组细胞中血红素氧合酶 (HO-1)、ROS 及一氧化氮 (NO) 含量的变化。结果: 转基因组荧光强度和数量比阴性对照组显著提高, 提示导入的 *ALDH2* 基因在 HUVECs 细胞得到高表达; 与空质粒对照组和阴性对照组比较, 转染 72 h 后, 转基因组细胞 *ALDH2* mRNA 和蛋白表达增加 ( $P < 0.01$ ); 不同浓度  $H_2O_2$  孵育 48 h 后, 转基因组 HUVECs 存活率明显升高 ( $P < 0.05$ ); 转基因组可抑制一定浓度  $H_2O_2$  诱导的 ROS 水平的升高、降低 HO-1 表达及增加 NO 的产生, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: *ALDH2* 基因高表达可降低低氧自由基引起的 HUVECs 细胞的损伤, 保护内皮细胞的生物学功能。

**[关键词]** 乙醛脱氢酶2; 转染; 氧化损伤; 一氧化氮; 内皮细胞

**[中图分类号]** R34-33; R361 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2016)11-1263-06

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2016.11.006

## A Preliminary Study of Improving the Function of Vascular Endothelial Cells with High Expression of ALDH2 Gene

HU Xiuying<sup>1</sup>, FANG Qin<sup>2</sup>, WANG Jishi<sup>1</sup>, MA Dan<sup>2</sup>, JIANG Li<sup>2</sup>

(1. Department of Hematology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Pharmacy, the Affiliated Baiyun Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the effect of aldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) gene on the proliferation and anti-oxidative damage of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods:** HUVECs were divided into 3 groups: transfected target gene group (transgenic group) transfected empty vector group (empty plasmid control group) and non transfected plasmid group (negative control group). In the transgenic group, the eukaryotic expression vector containing human ALDH2 gene was introduced into HUVECs by liposome mediated method. Western blot RT-PCR were used to detect the expression of ALDH2 gene and protein in each group. Different concentration of  $H_2O_2$  (0, 50, 75, 100 and 125  $\mu\text{mol/L}$ ) were incubated with HUVECs. 48 hours later, the level of cell proliferation and the degree of oxidative damage were detected in the cells of each group and the changes of HO-1, ROS and NO level were detected in the cells of each group. **Results:** The fluorescence intensity and number of transgenic group were significantly higher than that of negative control group, suggesting that the ALDH2 gene was highly expressed in HUVECs cells. Compared with empty plasmid control group and

\* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81360501); 贵州省科学技术基金资助项目 [黔科合 SY 字 (2012) 3138]; 贵州省科学技术基金资助项目 [黔科合 LH 字 (2014) 7130]; 贵州省省长基金临床应用课题专项研究资助项目 [黔省专合字 (2012) 97]

\*\* 通信作者 E-mail: fq\_fangqin@sina.com

网络出版时间: 2016-11-15 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20161115.1757.019.html>

negative control group, the expression of mRNA and protein of ALDH2 gene in the transgenic group were increased ( $P < 0.01$ ) 72 h after transfection. The survival rate of HUVECs cells in transgenic group was significantly increased ( $P < 0.05$ ) after 48 h incubation with different concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The transgenic group could inhibit the increase of ROS induced by a certain concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, reduce the expression of HO-1 and increase the production of NO, and the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** High expression of ALDH2 Gene can reduce the damage of HUVECs cells induced by low oxygen free radicals, and protect the biological function of endothelial cells.

[**Key words**] aldehyde dehydrogenase 2; transfection; oxidation damage; nitric oxide; endothelial cell

骨髓造血微环境内有大量由血管内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 构成的血窦存在, 它与造血干细胞密切接触, 影响造血细胞的增殖与自我更新、迁移及定位<sup>[1]</sup>。然而, ECs 在移植后, 在机体病理状态下易受到氧化应激、炎症因子以及药物等刺激因素引起的损伤, 而氧化应激引起的损伤是内皮损伤发生发展过程中的共同机制之一<sup>[2]</sup>。研究 ECs 氧化损伤机制及其保护对策, 对于维持 ECs 功能的完整性, 保护血管微环境, 促进造血重建具有积极的意义。乙醛脱氢酶 2 (aldehyde dehydrogenase 2, ALDH2) 是乙醛脱氢酶 (ALDH) 家族中醛类代谢活性最强的同工酶, 参与了各种内源性和外源性脂肪族及芳香族醛类物质代谢或解毒的过程, 具有脱氢酶和酯酶等多种酶功能<sup>[3]</sup>。由于 ALDH2 在保护细胞抗毒性、抗氧化损伤及抗凋亡等方面的作用明显, 被广泛的应用于消化系统和心脑血管疾病等防治的研究中, 但是在造血微环境的细胞内皮功能方面研究较少, 其改善血管内皮功能作用机制有待进一步研究和阐明<sup>[4-5]</sup>。本课题将 ALDH2 基因导入人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 探讨其对 HUVECs 增殖和抗氧化损伤的影响, 研究 ALDH2 基因改善血管内皮功能的作用, 为下一步研究其改善造血微环境的功能提供体外的实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞和试剂

人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 细胞株由贵州医科大学免疫细胞室提供并鉴定。真核表达载体 pcDNA3.1/myc-HisA<sup>+</sup>-ALDH2 构建方法由本实验室提供, 经 PCR、EcoR I 及 BamHI 酶切及送金思特科技 (南京) 有限公司测序序列比对正确率 100%<sup>[6-7]</sup>。THIzol、逆转录试剂盒、Lipofectami-

neTM2000 (脂质体) 均为美国 Invitrogen 公司产品, 胰蛋白酶为美国 Amresco 公司产品, MTT、DMSO 为南京赛兰博科技有限公司产品, L-DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司, 鼠抗人 ALDH2 一抗、羊抗鼠二抗购置中国台湾 Abnova 公司, ALDH2、血红素氧合酶 1 (HO-1)、 $\beta$ -actin 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。一氧化氮 (NO) 检测试剂盒购置南京建成生物工程研究所, ECL 发光试剂由美国 Santa Cruz 公司提供, 活性氧检测试剂盒购自上海碧云天生物技术研究所以。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 HUVECs 细胞培养和 ALDH2 转染细胞系的建立** HUVECs 细胞接种于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素和 0.03% L-谷氨酰胺的 DMEM 培养基, 以  $5 \times 10^4$ /mL 细胞密度接种至 50 mL 培养瓶, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度下培养、传代。实验分为转染目的基因组 (转基因组)、转染空载体组 (空质粒对照组) 以及未转染质粒组 (阴性对照组)。转染前将待转染人 HUVECs 细胞消化成悬浮状态, 以  $1 \times 10^5$ /mL 细胞密度接种于 6 孔板上, 每孔 3 000  $\mu$ L, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中备用; 待 6 孔板中细胞生长至  $1.5 \times 10^6$ /mL 左右时, 将含目的基因质粒和空载体质粒各 2  $\mu$ g 与脂质体 8  $\mu$ L 加入 500  $\mu$ L 不含血清双抗的培养基中, 混匀后室温放置 15 min 后分别对应加入转基因组和空质粒对照组。阴性对照组只加 500  $\mu$ L 不含血清双抗的培养基。将 3 组细胞置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 2 h 后, 向 3 组细胞中各加入 5 mL 预热至 37 °C 的 DMEM 培养基 (含血清及双抗) 继续孵育。转染 48 h 后的 HUVECs 细胞换用含 500 mg/L G418 的培养基, 每 3 ~ 5 d 换液 1 次, 筛选 2 周至抗性克隆形成后, 换用 250 mg/

L G418 继续筛选 1 周得到转染目的基因的细胞。

**1.2.2** HUVECs 细胞转染情况 采用间接免疫荧光法观察细胞转染情况。将转染 24、48、72、96 和 120 h 后使各孔细胞贴附于玻片上,采用多聚甲醛固定 10 min 制成细胞爬片。pH7.4 的 0.01 mol/L PBS 洗涤两次,滴加含 5% 小牛血清的封闭液,37 °C 封闭 30 min。PBS 洗涤 1 次,每次 5 min,滴加特异性 *ALDH2* 小鼠抗人一抗(1:3 000),4 °C 孵育过夜。含 0.5% Triton X-100 的 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,滴加荧光素标记二抗(羊抗小鼠 FITC-IgG,1:100),37 °C,避光孵育 30 min。含 0.5% Triton X-100 的 PBS 洗涤 3 次后,伊文斯兰染色,滴加 10% 甘油磷酸缓冲液封片,荧光显微镜下观察荧光强度,拍照,根据荧光强度判断蛋白表达的强弱。

**1.2.3** *ALDH2* mRNA 和蛋白的表达检测 采用逆转录 PCR(RT-PCR)法检测 *ALDH2* mRNA。收集各孔细胞,用 TRIZOL 试剂提取细胞总 RNA,按照逆转录试剂盒说明逆转录合成 cDNA,并将逆转录的 cDNA 作为模板进行 PCR 反应,检测 *ALDH2* 基因 mRNA 的表达。 $\beta$ -actin1 作为内对照,PCR 引物如下: $\beta$ -actin1 上游 5'-CTGGGACGACATGGAGAA-3',下游 5'-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3'(564 bp);*ALDH2* 上游 5'-GACACGGATCCATGTTGCCGCTGCCGCCGCTTCGG-3',下游 5'-GACACGAATCTTATGAGTCTTCTGAGGCACTTTGAC-3'(1 576 bp)。PCR 条件是 94 °C 预变性 5 min,然后 35 循环包括 94 °C 变性 50 s,65 °C 退火 45 s;72 °C 延伸 60 s,最后 72 °C 延伸 min。反应结束后,取反应液 10  $\mu$ L 进行琼脂糖凝胶电泳,照相记录结果。使用 BandsScan 软件分析条带结果,计算得到目的基因的 mRNA 相对表达量。采用 Western blot 检测蛋白表达情况,将各孔细胞消化后,PBS 洗 2 次,加入细胞裂解液 100  $\mu$ L 在冰上裂解 30 min,裂解过程反复剧烈振荡。12 000 r/min 离心 15 min,吸取上清备用。BCA 蛋白定量试剂盒测蛋白含量。上述方法得来的样品处理液加入上样 Buffer,然后放在沸水(>95 °C)浴中加热 5 min 使蛋白变性,作为点样用样品。表达产物经过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至 PVDF 膜上。经封闭液(5% 脱脂奶粉,1  $\times$  PBS,pH 7.4)封闭后加鼠抗人 *ALDH2* 一抗(1:2 500)孵育 2 h 后洗涤,加入羊抗鼠二抗(1:500)室温孵育 1 h,洗膜后用 ECL 试剂滴加在膜上,曝光显影,洗出条带。

**1.2.4** 过氧化氢( $H_2O_2$ )细胞毒性 采用 MTT 法检测  $H_2O_2$  细胞毒性。取各组细胞,调整细胞密度为  $1.5 \times 10^5$ /mL,各取 100  $\mu$ L 加入 96 孔板中,再分别加入不同浓度  $H_2O_2$ (0、50、75、100 和 125  $\mu$ mol/L)孵育各组细胞 24 h,每孔设 6 个复孔,以未加药组为对照。37 °C、5%  $CO_2$ 、饱和湿度下培养 48 h 后,取出 96 孔板,每孔加 MTT(5 g/L)液 20  $\mu$ L,放回培养箱中继续孵育 4 h 后终止培养。1 500 r/min、37 °C、离心 5 min,吸弃上清。每孔加入二甲基亚砷 100  $\mu$ L,置摇床上摇 10 min,使结晶充分溶解。选择测定波长 570 nm(490 nm 为对照),酶标仪上测定各孔吸光度,并记录结果。按公式计算存活率:存活率(%) = A 试验组/A 对照组  $\times$  100%。

**1.2.5** *HO-1* mRNA 检测 经不同浓度  $H_2O_2$  的 DMEM 培养基孵育 48 h 之后,收集各孔细胞进行 RT-PCR 反应,检测 *HO-1* mRNA 的表达。以  $\beta$ -actin2 作为内参,反应条件如前面所述,*HO-1* 上游 5'-CAGGCAGAGAATGCTGAGTTC-3',下游 5'-GATGTTGAGCAGGAACGCAGT-3'(550 bp); $\beta$ -actin2 上游 5'-GCTCGTCTCGACAACGGCTC-3',下游 5'-CAAA-CATGATCTGGGTTCATCTTCTC-3'(353 bp)。如前所述计算得到目的基因的相对表达量。

**1.2.6** ROS 检测 采用免疫荧光法检测 ROS,按照试剂盒说明书操作。取各组细胞,调整细胞密度为  $1.5 \times 10^5$ /mL,各取 2.5 mL 加入六孔板中,再加入 2.5 mL 含不同浓度  $H_2O_2$  的 DMEM 培养基(终浓度分别为 0、50、75、100 和 125  $\mu$ mol/L),每组设三个复孔。培养 48 h 后收集细胞。加入稀释好的 DCFH-DA 500  $\mu$ L,37 °C 孵育 20 min。DCFH-DA 本身没有荧光,但进入细胞后,可被细胞内酶水解生成 DCFH,ROS 可以氧化无荧光的 DCFH 生成有荧光 DCF,检测 DCF 的荧光可反映细胞内 ROS 的水平。用无血清的 DMEM 培养基洗 3 次后,加入无血清培养液 3 mL 吹打均匀,在 30 min 时通过荧光分光光度计测定荧光强度,激发波长为 488 nm,发射波长 535 nm。

**1.2.7** NO 含量检测 采用硝酸还原酶法检测 NO 的含量。按照 NO 检测试剂盒说明,加入试剂混匀,室温静置 10 min,蒸馏水调零,550 nm,0.5 cm 光径,采用可见分光光度法测各管吸光度值。NO 含量计算公式:NO 含量( $\mu$ mol/L) = ((测定管吸光度 - 空白管吸光度)/(标准管吸光度 - 空白管吸光度))  $\times$  标准品浓度(100  $\mu$ mol/L)  $\times$  样品测试前稀释倍数。

### 1.3 统计学处理

应用 SPSS 13.0 分析软件, 每组实验重复 3 次。结果用均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。组间比较采用 ANOVA 检验或成组 *t* 检验, 组内比较采用配对 *t* 检验。  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ALDH2 基因转染情况

转基因组荧光强度和数量比阴性对照组显著

提高, 提示导入的 *ALDH2* 基因在 HUVECs 细胞得到高表达。24 h 时, 与阴性对照组相比, 空质粒对照组的荧光强度没有明显差别, 但是转染 *ALDH2* 基因的细胞可见微弱荧光; 72 h 时, *ALDH2* 蛋白在转基因组中呈现较高的表达。以 72 h 转基因组细胞荧光强度为对照, 24 h 呈现较弱表达, 48 h 表达的荧光与 72 h 的荧光强度均属强表达, 96 h 之后逐渐减弱, 并且转基因组的荧光至少可以维持 7 d 以上。见图 1。



A: 阴性对照组 48 h                      B: 空载体对照组 48 h                      C: 转基因组 48 h

图 1 HUVECs 中 ALDH2 蛋白荧光强度

Fig. 1 Expression of ALDH2 protein in HUVECs by indirect immunofluorescence assay

### 2.2 ALDH2 mRNA 和 ALDH2 蛋白的表达

RT-PCR 检测 3 组细胞的在转染 72 h 后 mRNA 的表达, 同时设立内参。RT-PCR 结果显示转基因组 *ALDH2* 的表达明显比空质粒对照组和阴性对照组高 ( $P < 0.01$ ) (图 2)。Western Blot 结果显示, 转染组在相对分子质量  $54 \times 10^3$  处出现较亮的目的条带, 空质粒对照组和阴性对照组很弱, 说明转染基因 *ALDH2* 在蛋白水平得到表达 ( $P < 0.01$ ) (图 3)。

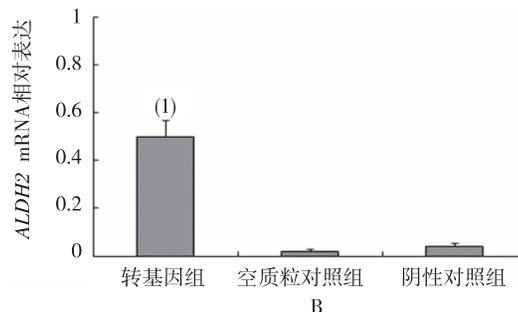
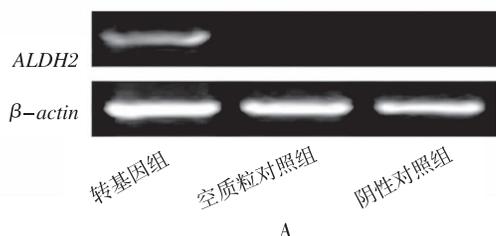
### 2.3 HUVECs 存活率

不同浓度  $H_2O_2$  孵育 48 h 后, 转基因组 HUVECs 存活率显著高于空质粒对照组和阴性对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05, n = 6$ ) (图 4), 显

示 *ALDH2* 基因转染之后内皮细胞对  $H_2O_2$  引起的氧化损伤耐受增加。

### 2.4 ROS、HO-1 mRNA 和内源性 NO 的表达

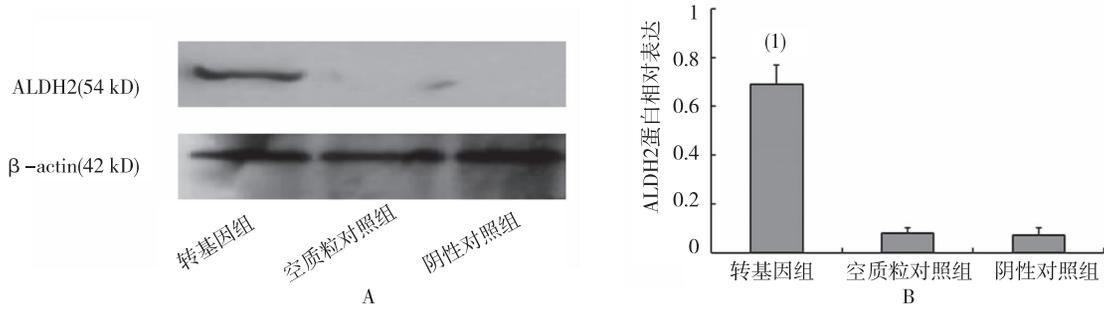
50、75、100 和 125  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  孵育 48 h, 各组 HUVECs 的 ROS 水平逐渐升高。与空质粒对照组比较, 75、100 和 125  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  浓度下, 转基因组 HUVECs 可抑制  $H_2O_2$  诱导的 ROS 水平的升高, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 说明在一定浓度范围内, *ALDH2* 转染能显著降低  $H_2O_2$  诱导的 ROS 水平的增高。不同浓度的  $H_2O_2$  孵育各组 HUVECs 细胞 48 h, 各组 HUVECs 的 HO-1 表达水平逐渐升高。与空质粒对照组及阴性对照组比较, 在 100、125  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  浓度下, 转基因组 HUVECs



注: A 为 RT-PCR 电泳图, B 为 相对灰度值; <sup>(1)</sup> 与阴性对照组、空质粒对照组比较,  $P < 0.01$

图 2 HUVECs 中 *ALDH2* mRNA 的表达 (RT-PCR)

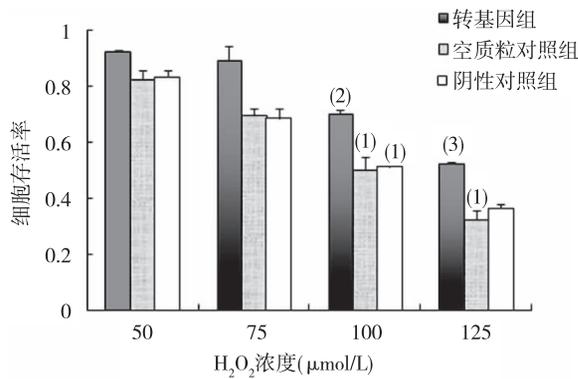
Fig. 2 Detection of *ALDH2* mRNA expression in HUVECs by RT-PCR



注:A 为 Western blot 蛋白印迹图,B 为相对灰度值;<sup>(1)</sup>与阴性对照组、空质粒对照组比较, $P < 0.01$

图 3 HUVECs 中 ALDH2 蛋白的表达(Western blot)

Fig. 3 Detection of ALDH2 protein expression in HUVECs by Western blot



<sup>(1)</sup>与同浓度  $H_2O_2$  处理的转基因组比较, $P < 0.05$ ;<sup>(2)</sup>与  $75 \mu\text{mol/L } H_2O_2$  处理的转基因组比较, $P < 0.05$ ;<sup>(3)</sup>与  $100 \mu\text{mol/L } H_2O_2$  处理的转基因组比较, $P < 0.05$

图 4 各  $H_2O_2$  浓度下 HUVECs 的存活率( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 4 Survival rates of HUVECs on different concentrations of  $H_2O_2$

表 1 不同浓度  $H_2O_2$  处理 48 h 后各组细胞  $HO-1$  mRNA 及 ROS,NO 水平( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1  $HO-1$  mRNA, ROS, NO levels in each cell group after treated with different concentrations of  $H_2O_2$  for 48 h

$H_2O_2$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	n	$HO-1$ mRNA			ROS(荧光强度/ $10^5$ cells)			NO( $\mu\text{mol}/10^4$ cells)		
		转基因组	空质粒对照组	阴性对照组	转基因组	空质粒对照组	阴性对照组	转基因组	空质粒对照组	阴性对照组
0	3	0.003 ± 0.002	0.003 ± 0.000	0.001 ± 0.002	345.0 ± 58.9	377.8 ± 34.1	322.3 ± 11.9	0.094 ± 0.032	0.041 ± 0.000	0.045 ± 0.009
50	3	0.003 ± 0.002	0.006 ± 0.004	0.009 ± 0.006	378.3 ± 35.0	398.9 ± 24.9	451.9 ± 24.7	0.055 ± 0.021	0.019 ± 0.001	0.024 ± 0.001
75	3	0.232 ± 0.012	0.209 ± 0.012	0.189 ± 0.009	489.6 ± 20.9 <sup>(1)</sup>	587.1 ± 41.2	537.8 ± 36.9	0.024 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.019 ± 0.003
100	3	0.544 ± 0.021 <sup>(1)</sup>	0.799 ± 0.009	0.724 ± 0.056	456.6 ± 33.5 <sup>(1)</sup>	678.1 ± 54.3	612.3 ± 52.0	0.020 ± 0.003 <sup>(1)</sup>	0.009 ± 0.000	0.011 ± 0.001
125	3	0.534 ± 0.01 <sup>(1)</sup>	0.897 ± 0.023	0.908 ± 0.011	589.4 ± 23.1 <sup>(1)</sup>	768.1 ± 13.9	709.7 ± 22.0	0.022 ± 0.000 <sup>(2)</sup>	0.007 ± 0.003	0.008 ± 0.000

与空质粒对照组比较,<sup>(1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>(2)</sup> $P < 0.01$

量堆积,损伤造血微环境,造血微环境中的多种基质细胞结构和功能受到损伤,影响造血重建。防护氧化损伤,对造血微环境的保护具有积极的意义。ALDH2 是乙醛脱氢酶(ALDH)家族中醛类代谢活性最强的同工酶,过去的研究表明,ALDH2 具有一

定的抗氧化损伤的作用<sup>[7]</sup>。本实验中将构建的 ALDH2 真核表达载体导入 HUVECs 中,研究 ALDH2 过表达在该细胞中的生物学作用及是否具有改善内皮功能的作用,为下一步明确其是否具有改善造血微环境及促进造血重建的功能提供前期的

### 3 讨论

造血微环境(hematopoietic inductive microenvironment, HIM)是造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)定居、增殖、分化和发育的场所,主要由基质细胞、基质细胞分泌的细胞因子及细胞外基质组成。而内皮细胞是基质细胞组成的重要成分之一。对肿瘤患者放或化疗及移植前预处理是损伤造血微环境的重要因素。该处理可产生大量的氧自由基及炎症因子,使得造血微环境中 ROS 大

实验依据。

本实验中,将构建 pcDNA3.1-ALDH2 真核表达载体转染进 HUVECs 中,并得到稳定表达。HUVECs 具有内皮细胞的大部分功能,所以我们选用该细胞系作为研究对象。为验证 ALDH2 促细胞增殖和抗氧化应激引起的损伤的作用,我们选用了  $H_2O_2$  作为过氧化反应的诱导剂,因为  $H_2O_2$  是典型的  $O_2$  还原生成  $H_2O$  的过程中的代谢产物,它的重要的生物学意义在于产生高活性的羟基基团,它的半衰期比 ROS 长,在体外实验中常被用于诱导氧化应激反应。本研究结果显示,随着  $H_2O_2$  浓度的增加, HUVECs 明显减少,而转染 ALDH2 之后,细胞的损伤程度降低,细胞活性明显比未转基因组高。ALDH2 可以保护 HUVECs 细胞对  $H_2O_2$  引起的损伤,促进细胞增殖,该过程伴随着 ROS 水平的降低,显示其可能与防护过氧化损伤有关。

本试验中被激活的 HO-1 (也是一种热休克蛋白)在转染 ALDH2 之后随着 ROS 的降低而降低。而在急性应激反应中,被激活的 HO-1 (也是一种热休克蛋白)反应了机体对氧化应激的防护。HO-1 在机体内是可诱导的,可以被强烈的诱导来对细胞应激和多种氧化刺激产生反应,热休克、重金属、血红素、应激、低氧、内毒素、细胞因子及氧化剂等均可诱导 HO-1 的适应性表达<sup>[8]</sup>。HO-1 通过分解血红素要消耗 3 分子  $O_2$ ,可消耗大量的内源性 ROS,减少组织的脂质过氧化来发挥抗氧化应激的作用。而且该过程伴随着 ROS 水平的下降和可以在急性应激反应中被激活的 HO-1 (也是一种热休克蛋白)的产生降低。ROS 和 HO-1 水平的下降可能是过氧化反应的终末产物 4-HNE 被 ALDH2 清除之后,与过氧化损伤相关的信号通路以及其他重要分子的作用没有被级联放大的结果。本实验结果显示,HO-1 的表达随着  $H_2O_2$  浓度的增加而增加,但是在转染 ALDH2 之后,伴随着 ROS 的减少也随之降低,进一步说明在 ALDH2 转染之后,细胞对氧化应激的防护能力得到了显著地提高。

NO 是内皮细胞释放最为重要的内皮源性血管舒张因子,除了能引起血管舒张外,还具有抑制炎症细胞的聚集分化、白细胞黏附、血小板聚集、平滑肌细胞增生等多种功能,对于维持血管内皮功能具有重要的作用<sup>[9]</sup>。NO 的水平高低也反映了内皮功能的情况。我们也发现经 ALDH2 基因转染细胞产生 NO 的能力明显高于转空载体组及未转基因组。因此,ALDH2 可能通过促进 NO 的产生

发挥内皮功能的保护效应,但是 ALDH2 能否通过 NO 促进 VEGF 的产生,从而促进血管的生成,还值得我们进一步的研究。

本实验中,高表达 ALDH2 基因促进 HUVECs 细胞的增殖并使 HUVECs 细胞对抗氧自由基引起的氧化损伤作用大大降低,该过程还伴随着 HO-1 表达和 ROS 水平的降低以及 NO 的产生的增加,这对进一步研究该基因在内皮细胞功能的保护和造血微环境中扮演的生物学功能提供了实验基础。

## 4 参考文献

- [1] Bianco P, Sacchetti B, Riminucci M. Osteoprogenitors and the hematopoietic microenvironment [J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2011(24): 37-47.
- [2] Sabuncuoğlu S, Kuskonmaz B, UckunCetinkaya D, et al. Evaluation of oxidative and antioxidative parameters in pediatric hematopoietic SCT patients [J]. Bone Marrow Transplant, 2012(47): 651-656.
- [3] Lang XE, Wang X, Zhang KR, et al. Isoflurane preconditioning confers cardioprotection by activation of ALDH2 [J]. Trends Cardiovasc Med, 2013(8): e52469.
- [4] Luo XJ, Liu B, Ma QL, et al. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase, a potential drug target for protection of heart and brain from ischemia/reperfusion injury [J]. Curr Drug Targets, 2014 (10): 948-955.
- [5] Zhang Y, Gu N, Miao L, et al. Alcohol dehydrogenase-1B Arg47His polymorphism is associated with head and neck cancer risk in Asian; a meta-analysis [J]. Tumour Biol, 2015 (2): 1023-1027.
- [6] Hu XY, Fang Q, Wang JS, et al. Over-expression of aldehyde dehydrogenase-2 protects against  $H_2O_2$ -induced oxidative damage and apoptosis in peripheral blood mononuclear cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2011(32): 245-252.
- [7] 王季石, 胡秀英, 方琴, 等. ALDH2 基因导入对 K562 细胞增殖和抗氧化损伤的影响 [J]. 中华血液学杂志, 2010 (31): 721-725
- [8] Durante W. Protective role of heme oxygenase-1 against inflammation in atherosclerosis [J]. Front Biosci (Landmark Ed), 2011(16): 2372-2388.
- [9] Qian J, Fulton DJ. Exogenous, but not Endogenous Nitric Oxide Inhibits Adhesion Molecule Expression in Human Endothelial Cells [J]. Front Physiol, 2012(3): 3.

(2016-07-22 收稿, 2016-10-30 修回)

中文编辑: 文箬颖; 英文编辑: 刘 华