文章编号:1000-5404(2011)07-0699-04

论著

高糖诱导人脐静脉内皮细胞 fractalkine 表达及其凋亡的研究

曾得康[1],李法琦[1],贾朝莉[2],张 彬[1],周 平[1] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第一医院老年病科[1],基础医学院生物化学与分子生物学教研室[2])

【摘要】 **目的** 探讨高糖诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell,HUVECs)fractalkine(FKN)表达与细胞凋亡的可能机制。**方法** 对数生长期的 HUVECs,分为正常组(N)、高糖组(HG)、氯化锂(lithium chloride,LiCl)组(LiCl)、高糖 + LiCl 组(HG + LiCl)。5.5 mmol/L 的低糖 DMEM 培养的 HUVECs 种板 10 h 后按以上分组加入 10 mmol/L 的 LiCl 预处理 2 h,再用 33.3 mmol/L 的高糖干预 48 h 后,用 TUNEL 法检测细胞凋亡,免疫组化 SABC 法检测 β-catenin 及 p-GSK-3β(Ser^9),免疫荧光 FITC 法检测 FKN 蛋白水平变化,RT-PCR 检测 GSK-3β 和 FKN mRNA 水平变化。**结果** ①与正常组比较,高糖诱导的 HUVECs 凋亡率明显增加($P<0.05$)。与高糖组比较,LiCl 可明显降低高糖环境下 HUVECs 的凋亡率($P<0.05$),但仍高于正常组($P<0.05$)。②与正常组比较,高糖组 HUVECs β-catenin 及 p-GSK-3β(Ser^9)蛋白表达降低($P<0.05$);GSK-3β mRNA 水平及 FKN 蛋白和 mRNA 水平升高($P<0.05$)。③与高糖组比较,LiCl + 高糖组 HUVECs β-catenin 及 p-GSK-3β(Ser^9)蛋白表达升高($P<0.05$),GSK-3β mRNA 水平($P<0.05$)及 FKN 蛋白和 mRNA($P<0.05$)水平降低。**结论** 高糖诱导的 HUVECs 凋亡可能与 Wnt 信号通路抑制和抑制 FKN 表达上调有关。

【关键词】 高糖;人脐静脉内皮细胞;fractalkine;Wnt;细胞凋亡
【中图法分类号】 R322.123;R329.26;R392.11 【文献标志码】 A

High glucose induces fractalkine expression and apoptosis in human umbilical vein endothelial cells

Zeng Dekang[1], Li Faqi[1], Jia Chaoli[2], Zhang Bin[1], Zhou Ping[1] ([1]Department of Geriatrics, First Affiliate Hospital, [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【**Abstract**】 **Objective** To explore the expression of fractalkine (FKN) and the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) induced by high glucose and its possible relationship with Wnt signaling pathway. **Methods** HUVECs in good condition were divided into 4 groups, normal group (DMEM + 5.5 mmol/L glucose), high glucose group (HG, 33.3 mmol/L glucose), lithium chloride group (10 mmol/L LiCl), and high glucose with lithium chloride group (HG + LiCl). After planted HUVECs in DMEM/LG (5.5 mmol/L) for 10 h, 10 mmol/L LiCl was added for 2 h as above and then 33.3 mmol/L glucose was added for 48 h. The apoptosis of HUVECs were evaluated by TUNEL assay. Protein levels of intracellular β-catenin and p-GSK-3β (Ser^9) were measured by immunohistochemistry staining (SABC). Expression of fractalkine was detected by immunofluorescence staining (FITC), and the mRNA expressions of GSK-3β and FKN were measured by RT-PCR. **Results** High glucose significantly induced a higher apoptotic rate in HUVECs than in normal control ($P<0.05$), but this increase of apoptotic rate was partly inhibited by LiCl ($P<0.05$), though the apoptosis of HG + LiCl still higher than normal control ($P<0.05$). Compare with normal control, HG suppressed the protein expressions of β-catenin and p-GSK-3β (Ser^9) ($P<0.05$), increased the mRNA levels of GSK-3β ($P<0.05$) and enhanced the fracalkine expression at both protein and mRNA levels ($P<0.05$). Compare with HG, the protein levels of β-catenin and p-GSK-3β (Ser^9) were improved ($P<0.05$), and the mRNA levels of GSK-3β ($P<0.05$) and both the protein and mRNA levels of fractalkine were decreased in HG + LiCl ($P<0.05$). **Conclusion** High glucose induces apoptosis of HUVECs, which may be through inhibiting Wnt signaling pathway and fractalkine upregulation.

【**Key words**】 high glucose; human umbilical vein endothelial cells; fractalkine; Wnt; apoptosis

Supported by the General Program of Medical Research of Chongqing Municipal Health Bureau (2009-2-367). Corresponding author: Li Faqi, Tel: 86-23-89012020, E-mail: faqili_2006@yahoo.com.cn

【基金项目】 重庆市卫生局医学科研计划面上项目(2009-2-367)
【通信作者】 李法琦,电话:(023)89012020,E-mail:faqili_2006@yahoo.com.cn

糖尿病(diabetes mellitus,DM)的发病率和死亡率逐年增加,在老年人群中尤为明显,严重影响着人类的生命健康。大量研究发现,炎症参与DM的发病和并发症的发生。高糖直接导致血管内皮细胞(endothelial cell,EC)功能失调、促进单核细胞黏附分子以及趋化因子的表达[1],进而促进炎症反应的发生发展。趋化因子作为炎症反应的主要参与者在这一过程中起着重要的作用[2]。其中fractalkine(FKN),即CX3CL1,是1997年由Bazan等[3]发现的CX3C类趋化因子,具有单核细胞粘附和趋化2种活性形式。多种因素激活ECs并使其表达FKN,如高糖诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells,HUVECs)表达FKN[4]并导致细胞凋亡[5],但其机制尚不清楚。而Wnt信号通路抑制亦参与高糖诱导的细胞代谢紊乱[6-7]。经典Wnt信号通路激动剂氯化锂(LiCl)通过抑制GSK-3β活性等一系列级联反应促进β-catenin入核激活下游转录因子而激活Wnt信号通路。但LiCl是否通过Wnt信号通路影响高糖环境下ECs FKN表达以及细胞凋亡少见文献报道。本研究以此为基础,研究LiCl预处理对高糖诱导HUVECs FKN的表达以及对细胞凋亡的影响及其潜在关系,初步探讨Wnt信号通路在其中的作用,从而为DM及其并发症的治疗提供实验基础和有效治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

HUVECs(中南大学湘雅医学院细胞库),DMEM低糖培养基(GIBCO),胰酶(Sigma-Aldrich),优等胎牛血清(杭州四季青公司),PBS、羊抗兔免疫组化试剂盒、DAB显色液、细胞凋亡检测试剂盒Ⅰ(POD)(武汉博士德生物工程有限公司),兔抗人p-GSK-3β(Ser^9)单克隆抗体、兔抗人β-catenin单克隆抗体(EPITOMICS, Inc),羊抗人fractalkine多克隆抗体(Santa Cruz biotechnology,Inc),兔抗羊FITC(北京中杉金桥生物技术有限公司),氯化锂[生工生物工程(上海)有限公司],Trizol试剂、逆转录试剂盒、PCR扩增试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司]。

1.2 方法

1.2.1 HUVECs培养及实验分组 HUVECs用含10%胎牛血清、2 mmol/L的L-谷氨酰胺的DMEM/低糖培养基,于37 ℃、5% CO_2、100%湿度的孵箱中常规传代培养。取对数生长期的HUVECs,以1×10^4/孔种于24孔板,以4×10^4/孔种于6孔板,分为正常对照组(N)、高糖组(HG)、氯化锂组(LiCl)、高糖+氯化锂组(HG+LiCl)。MTT证实,33.3 mmol/L高糖为最佳高糖建模浓度,10 mmol/L LiCl为最佳预处理浓度。正常组用5.5 mmol/L的DMEM/低糖培养基,高糖组用33.3 mmol/L的DMEM/高糖培养基,LiCl组用含终浓度为10 mmol/L LiCl的低糖(5.5 mmol/L)培养基,高糖+LiCl组用含终浓度为10 mmol/L LiCl的高糖(33.3 mmol/L)培养基。DMEM/低糖培养的HUVECs种板10 h后按以上分组加入10 mmol/L的LiCl预处理2 h,再用33.3 mmol/L的高糖干预48 h后,细胞75%~80%融合,检测各项指标。

1.2.2 TUNEL法检测内皮细胞凋亡 按上述分组处理后,根据武汉博士德提供的TUNEL检测说明书操作。实验完毕后立即照相。细胞核中有棕黄色颗粒者为凋亡阳性细胞;细胞核为蓝色者为正常细胞。计数1 000个细胞,计算凋亡率。

1.2.3 免疫组化SABC法检测β-catenin、p-GSK-3β(Ser^9)及免疫荧光FITC法检测FKN蛋白水平 按1.2.2处理各组细胞后,按说明书操作。照相后以Image-Pro Plus 6.0软件分析平均光密度值及荧光强度。

1.2.4 RT-PCR检测GSK-3β及FKN mRNA水平变化 按1.2.2处理各组细胞后,采用Trizol试剂法提取总RNA,严格按照宝生物的说明书进行。注意加入氯仿离心后小心吸取上清和后面几步离心后吸干异丙醇和75%乙醇。提取完毕后分装,每组留1支逆转录,其他-80 ℃保存。按表1设计引物。逆转录和扩增均按宝生物说明书操作,并按如下条件进行PCR扩增:94 ℃变性30 s,表1中的温度退火30 s,72 ℃延伸45 s,扩增35个循环。PCR扩增产物经行1.5%的琼脂糖凝胶电泳后,用Quantity one v 4.62软件照相并分析其灰度值。以目的基因与内参的比值进行统计分析。

表1 基因引物序列

基因	引物序列	片段大小	退火温度
β-actin	上游 5′-CTGGGACGACATGGAGAAAA-3′	564 bp	59.4 ℃
	下游 5′-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3′		
GSK-3β	上游 5′-CCTCAAATTAAGGCACATCC-3′	376 bp	56 ℃
	下游 5′-CACGGTCTCCAGTATTAGCATC-3′		
FKN	上游 5′-CCGAAGGAGCAATGGGTCAAGG-3′	304 bp	63 ℃
	下游 5′-CATCCTGAGCCTTTGGCGTCG-3′		

1.3 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示。采用SPSS 17.0统计软件,各组间均数比较用单因素方差分析。

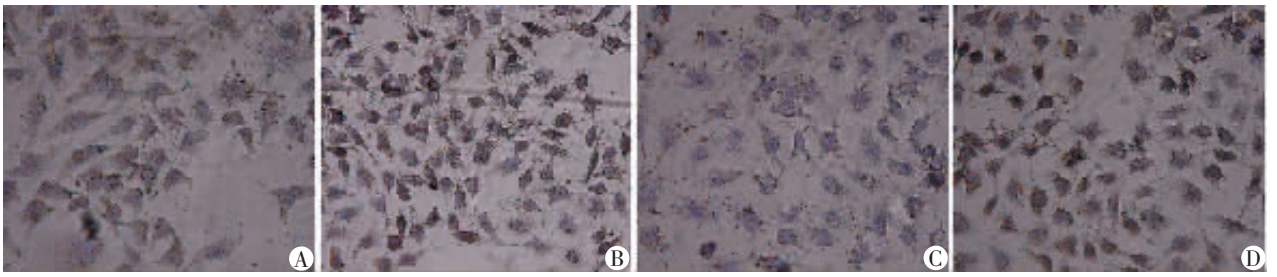
2 结果

2.1 氯化锂抑制高糖诱导HUVECs凋亡

经33.3 mmol/L的高糖处理后,HUVECs的凋亡率(12.9±0.6)%较正常组(3.5±0.7)%明显增加($P<0.05$)。LiCl可降低低糖培养HUVECs凋亡率(2.9±0.7)%,但与正常组无明显差别($P>0.05$)。LiCl预处理可明显降低高糖环境下HUVECs的凋亡率(7.9±0.5)%($P<0.05$),但与正常组仍有差别($P<0.05$)。见图1。

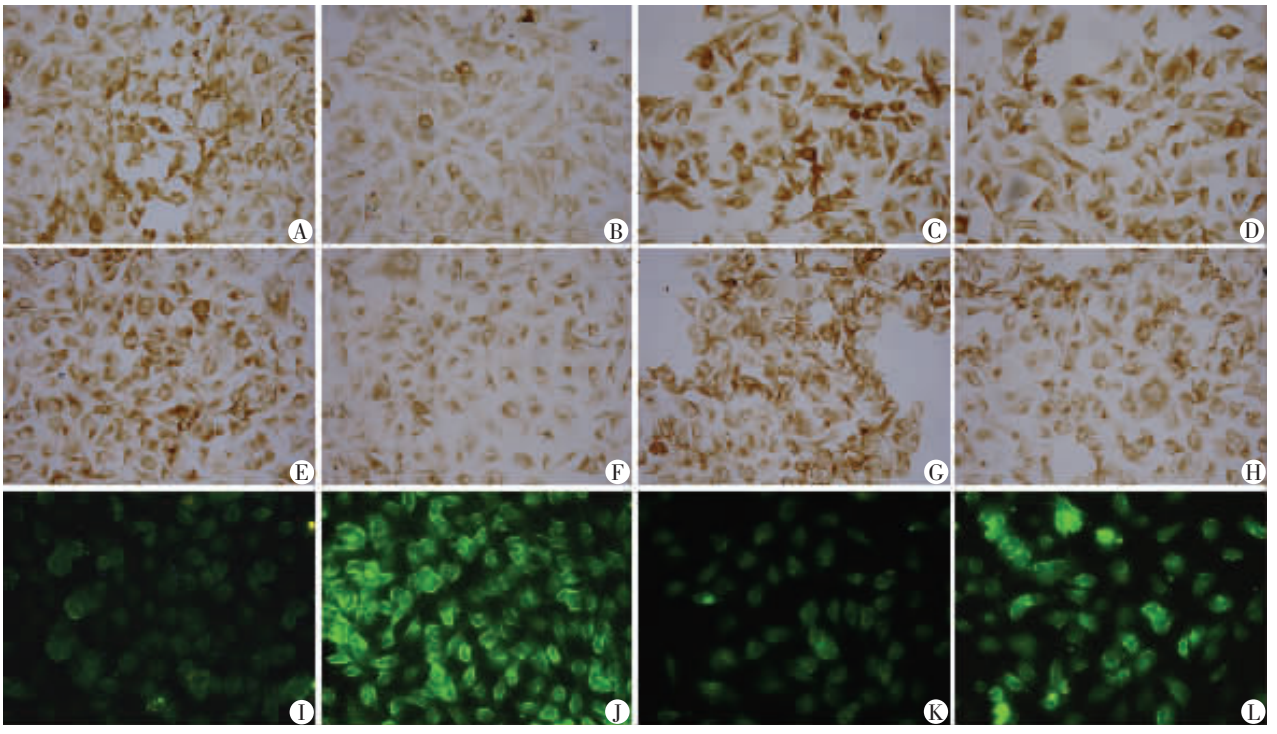
2.2 氯化锂对HUVECs β-catenin、p-GSK-3β(Ser^9)及FKN蛋白表达的影响

与正常组比较,高糖组HUVECs β-catenin和p-GSK-3β(Ser^9)蛋白表达明显降低($P<0.05$),LiCl预处理可抑制高糖的这一作用,与高糖组比较,LiCl加高糖组β-catenin和p-GSK-3β(Ser^9)蛋白表达增高($P<0.05$),但其蛋白水平仍明显低于正常组($P<0.05$)。同时,与正常组比较,高糖组HUVECs FKN蛋白表达明显增加($P<0.05$),且LiCl预处理亦部分抑制FKN表达,与高糖组比较,LiCl加高糖组FKN表达明显降低($P<0.05$),但仍高于正常组(图2,表2)。



A:正常组;B:HG 组;C:LiCl 组;D:HG + LiCl 组

图 1　氯化锂部分抑制高糖诱导的 HUVECs 凋亡　(TUNEL ×200)



A ~ D:β-catenin;E ~ H:p-GSK-3β(Ser^9);I ~ L:FKN;A、E、I:正常组;B、F、J:HG 组;C、G、K:LiCl 组;D、H、L:HG + LiCl 组

图 2　免疫组化检测 β-catenin、p-GSK-3β(Ser^9)及免疫荧光检测 FKN 蛋白表达　(SABC/FITC ×200)

表 2　各组 β-catenin、p-GSK-3β(Ser^9)和 FKN 蛋白水平变化($\bar{x} \pm s$)

组别	β-catenin	p-GSK-3β(Ser^9)	FKN
正常组	0.153 ± 0.021	0.162 ± 0.014	0.038 ± 0.004
HG 组	0.102 ± 0.007[a]	0.097 ± 0.008[a]	0.095 ± 0.017[a]
LiCl 组	0.163 ± 0.014	0.158 ± 0.008	0.044 ± 0.011
HG + LiCl 组	0.133 ± 0.013[ab]	0.147 ± 0.007[ab]	0.071 ± 0.009[ab]

a:$P < 0.05$,与正常组比较;b:$P < 0.05$,与 HG 组比较

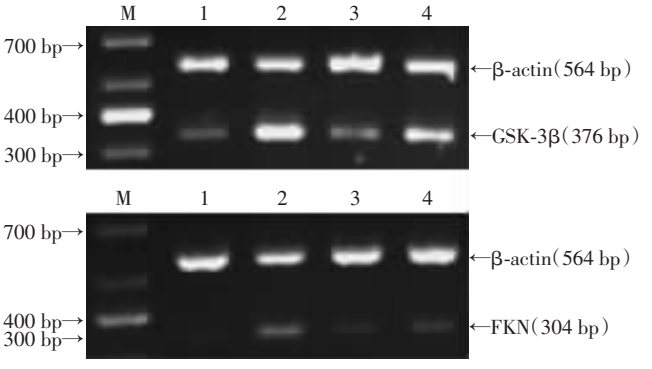
2.3　氯化锂抑制高糖诱导的 GSK-3β 和 FKN mRNA 表达

与正常组比较,高糖组 HUVECs GSK-3β、FKN mRNA 水平均明显升高($P < 0.05$),且可被 LiCl 预处理部分抑制,与高糖组比较,LiCl 加高糖组 GSK-3β、FKN mRNA 明显降低,但仍明显高于正常组($P < 0.05$,表 3,图 3)。

表 3　各组 GSK-3β 和 FKN mRNA 表达水平变化($\bar{x} \pm s$)

组别	GSK-3β	FKN
正常组	0.268 ± 0.003	0.102 ± 0.008
HG 组	1.541 ± 0.029[a]	0.464 ± 0.007[a]
LiCl 组	0.447 ± 0.027	0.163 ± 0.002
HG + LiCl 组	0.980 ± 0.020[ab]	0.221 ± 0.010[ab]

a:$P < 0.05$,与正常组比较;b:$P < 0.05$,与 HG 组比较



M:DNA 标准;1:正常组;2:HG 组;3:LiCl 组;4:HG + LiCl 组

图 3　RT-PCR 检测各组 GSK-3β 及 FKN mRNA 表达

3　讨论

局部激活炎症反应对 DM 及其并发症的形成起着重要作用[8]。在高血糖、高胰岛素血症等因素导致内皮功能失调后,血管 ECs 选择性表达一些黏附分子和

趋化因子[1]，如 FKN、TNF-α、INF-γ 等多种促炎因子均可诱导 ECs 高表达 FKN[9]。本研究发现，高糖诱导 HUVECs 高表达 FKN 并诱导细胞凋亡，与最新国外的研究报道一致[4,6]。

Chong 等[7]的研究显示，25 mmol/L 的高糖干预 ECs 48 h 后 Wnt1 和 p-GSK-3β 表达均明显降低。本研究发现，高糖诱导 HUVECs FKN 表达及细胞凋亡的同时，其 GSK-3β mRNA 表达上调且 p-GSK-3β(Ser^9)蛋白表达下调，增加 GSK-3β 活性致 β-catenin 的胞浆水平下调；经经典 Wnt 信号通路激动剂 LiCl 预处理 HUVECs 后，高糖诱导的 GSK-3β mRNA 水平降低，p-GSK-3β(Ser^9)及 β-catenin 水平均上调，提示高糖抑制的经典 Wnt 信号通路激活可被 LiCl 纠正。同时，LiCl 还明显降低 HUVECs 的凋亡率及 FKN 蛋白和基因水平，提示 Wnt 信号通路可能调控高糖诱导 HUVECs 凋亡和 FKN 表达。

大量证据表明 Wnt 信号通路在细胞代谢，尤其是 DM 引起的细胞代谢失调中起着重要作用[10]。DM 患者脂肪组织、胰脏、肝脏中 Wnt5b 可调节脂肪细胞功能[11]，且 Wnt4 和 Wnt5a 可抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡[6]。Wnt1 是高糖环境下重要的 EC 保护剂，经 Wnt1 蛋白处理可明显抑制高糖诱导的 ECs 凋亡[7]。GSK-3β 是经典 Wnt 信号通路的负性调控因子，抑制其活性可影响细胞生存和炎症反应[12]，重组的 Wnt5a 及其他 GSK-3β 抑制剂可抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡[6]。因此，GSK-3β 是可作用于多种失调的治疗靶点[13]。LiCl 是经典 Wnt 信号通路的激动剂，通过降低 GSK-3β 活性起作用。本研究发现，LiCl 抑制 GSK-3β 活性可提高高糖环境下 ECs 的存活，进一步表明经典 Wnt 信号通路对 ECs 具有重要的保护作用。

Masckauchan 等[14]的研究也显示，Wnt/β-catenin 信号通路可诱导 ECs 的存活和增殖，这与我们的观点一致。另外，有研究显示，炎症因子也参与细胞凋亡的发生[5,15]，而本研究发现高糖诱导 HUVECs FKN 高表达的同时，细胞凋亡明显增加，是否 FKN 本身也参与了 HUVECs 的凋亡有待进一步研究。

本研究揭示了高糖抑制 HUVECs 经典 Wnt 信号通路，诱导趋化因子 FKN 表达且可被 LiCl 部分抑制。同时，LiCl 还部分抑制高糖诱导的 HUVECs 凋亡。提示高糖诱导的 HUVECs 凋亡和 FKN 的表达可能与 Wnt 信号通路有关，以及高糖诱导的 HUVECs 凋亡可能与 FKN 和 Wnt 信号通路有关。由此我们推测，适当激活 Wnt 信号通路或者抑制 FKN 表达而降低血管 ECs 凋亡和抑制炎症反应，可能有益于 DM 的治疗。从而也为 DM 研究找到了新的切入点，为 DM 及其并发症的治疗找到新的突破口。

参考文献：

[1] Manduteanu I, Voinea M, Antohe F, *et al*. Effect of enoxaparin on high glucose-induced activation of endothelial cells[J]. Eur J Pharmacol, 2003, 477(3): 269 - 276.

[2] Mach F. The role of chemokines in atherosclerosis[J]. Curr Atheroscler Rep, 2001, 3(3): 243 - 251.

[3] Bazan J F, Bacon K B, Hardiman G, *et al*. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif[J]. Nature, 1997, 385(6617): 640 - 644.

[4] Manduteanu I, Pirvulescu M, Gan A M, *et al*. Similar effects of resistin and high glucose on P-selectin and fractalkine expression and monocyte adhesion in human endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 391(3): 1443 - 1448.

[5] Zhang Y, Shi H, Sun G, *et al*. High Glucose Induces Dysfunction and Apoptosis in Endothelial Cells: Is the Effect of High Glucose Persistence more Important than Concentration?[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2010 Jul 12. [Epub ahead of print]

[6] Lin C L, Wang J Y, Huang Y T, *et al*. Wnt/beta-catenin signaling modulates survival of high glucose-stressed mesangial cells[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(10): 2812 - 2820.

[7] Chong Z Z, Shang Y C, Maiese K. Vascular injury during elevated glucose can be mitigated by erythropoietin and Wnt signaling[J]. Curr Neurovasc Res, 2007, 4(3): 194 - 204.

[8] He Z, King G L. Protein kinase Cbeta isoform inhibitors: a new treatment for diabetic cardiovascular diseases[J]. Circulation, 2004, 110(1): 7 - 9.

[9] Imaizumi T, Yoshida H, Satoh K. Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells[J]. J Atheroscler Thromb, 2004, 11(1): 15 - 21.

[10] Jin T. The WNT signalling pathway and diabetes mellitus[J]. Diabetologia, 2008, 51(10): 1771 - 1780.

[11] Kanazawa A, Tsukada S, Sekine A, *et al*. Association of the gene encoding wingless-type mammary tumor virus integration-site family member 5B (WNT5B) with type 2 diabetes[J]. Am J Hum Genet, 2004, 75(5): 832 - 843.

[12] Chong Z Z, Li F, Maiese K. The pro-survival pathways of mTOR and protein kinase B target glycogen synthase kinase-3beta and nuclear factor-kappaB to foster endogenous microglial cell protection[J]. Int J Mol Med, 2007, 19(2): 263 - 272.

[13] Chong Z Z, Li F, Maiese K. Oxidative stress in the brain: novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease[J]. Prog Neurobiol, 2005, 75(3): 207 - 246.

[14] Masckauchan T N, Shawber C J, Funahashi Y, *et al*. Wnt/beta-catenin signaling induces proliferation, survival and interleukin-8 in human endothelial cells[J]. Angiogenesis, 2005, 8(1): 43 - 51.

[15] Guo S, Meng S, Chen B, *et al*. C-Reactive Protein Can Influence the Proliferation, Apoptosis, and Monocyte Chemotactic Protein-1 Production of Human Umbilical Vein Endothelial Cells[J]. DNA Cell Biol, 2010 Oct 27. [Epub ahead of print]

（收稿：2010-10-27 修回：2010-12-10）

（编辑　吴培红）