文章编号:1000-5404(2012)06-0481-04

论著

LXRs激动剂T0901317通过PI3K/Akt增强人脐静脉内皮细胞的增殖能力

王 强,余 洁,王 航,卢 巍,邓梦杨,康华利,黄 岚 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管病研究所)

[摘要] **目的** 观察肝X受体(liver X receptors,LXRs)激动剂T0901317对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell,HUVEC)增殖活性的影响。**方法** 体外分离和培养原代HUVEC,不同浓度的T0901317(0、0.5、2、5 μmol/L)干预HUVEC 48 h后,采用MTS法检测HUVEC增殖情况;Western blot检测磷酸化Akt(Ser^{473})及总Akt的表达。**结果** T0901317(0~5 μmol/L)呈浓度依赖性的促进HUVEC的增殖($P<0.01$)和上调HUVEC中p-Akt-Ser^{473}的表达($P<0.01$),PI3K抑制剂LY294002(10 μmol/L)和基因转录抑制剂放线菌素-D(actinomycin D,Act-D,5 μg/ml)可以阻断T0901317(5 μmol/L)上调p-Akt-Ser^{473}的作用($P<0.01$),提示T0901317通过基因转录调节的方式激活PI3K/Akt信号,此外,PI3K抑制剂LY294002(10 μmol/L)预处理可以逆转T0901317(5 μmol/L)促HUVEC增殖作用($P<0.01$)。**结论** LXRs激动剂T0901317可通过激活PI3K/Akt信号通路增强HUVEC的增殖能力。

[关键词] 肝X受体;人脐静脉内皮细胞;细胞增殖;PI3K/Akt信号通路
[中图法分类号] R322.123;R329.26;R341 [文献标志码] A

Liver X receptors agonist T0901317 promotes human umbilical vein endothelial cell proliferation *via* activation of PI3K/Akt pathway

Wang Qiang, Yu Jie, Wang Hang, Lu Wei, Deng Mengyang, Kang Huali, Huang Lan (Institute of Cardiovascular Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effect of liver X receptors (LXRs) agonist T0901317 on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) proliferation. **Methods** The HUVECs isolated and cultured *in vitro* were treated with different concentrations of T0901317 (0, 0.5, 2 and 5 μmol/L) for 48 h. The proliferation of HUVECs was evaluated by MTS assay. The expressions of phospho-Akt (Ser^{473}) and total Akt were detected by Western blotting. **Results** The HUVEC proliferation was significantly promoted and the phospho-Akt (Ser^{473}) expression was significantly upregulated by T0901317 in a dose-dependent manner ($P<0.01$). The upregulation of phospho-Akt (Ser^{473}) induced by T0901317 could be blocked by PI3K inhibitor LY294002 (10 μmol/L) and gene transcription inhibitor actinomycin D (Act-D) (5 μg/ml) ($P<0.01$), indicating T0901317 activated PI3K/Akt pathway through regulating gene transcription. Moreover, pretreatment of HUVECs with LY294002 (10 μmol/L) could reverse T0901317-induced HUVEC proliferation ($P<0.01$). **Conclusion** The LXRs agonist T0901317 can promote HUVEC proliferation through the activation of PI3K/Akt pathway.

[**Key words**] liver X receptors; human umbilical vein endothelial cell; cell proliferation; PI3K/Akt pathway

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81100112). Corresponding author: Huang Lan, Tel: 86-23-68755601, E-mail: huanglan260@yahoo.com.cn

血管内皮损伤是动脉粥样硬化、高血压、糖尿病、介入治疗后再狭窄等多种血管损伤性疾病共同的病理生理基础,邻近内皮细胞的再生在损伤血管再内皮化的过程中有着非常重要的作用[1]。因此,探讨如何促进血管内皮细胞的有益增殖对血管损伤性疾病的防治有着重要意义。

肝X受体(liver X receptors,LXRs)是核受体超家族成员,包括LXRα和LXRβ两种同源亚型,二者在DNA结合区和配体结合区大约有78%的氨基酸同源,LXRα在肝脏、巨噬细胞等高水平表达,LXRβ则广泛表达于全身各组织中[2]。前期的研究发现,LXRs作

[基金项目] 国家自然科学基金(81100112)
[通信作者] 黄 岚,电话:(023)68755601,E-mail: huanglan260@yahoo.com.cn

为氧化型固醇激活的核受体，调控胆固醇代谢过程中一些关键基因的表达，是机体的胆固醇代谢感受器；此外，LXRs还参与调节机体其他生理活动，包括脂肪形成、糖代谢、巨噬细胞的天然免疫和炎症反应等[3-4]。研究证实，LXRs在防治动脉粥样硬化的发生、发展过程中发挥着重要的作用[5]。前期的实验发现，LXRs可表达于血管内皮细胞并且参与调节内皮细胞的胆固醇代谢[6]。然而，LXRs在血管损伤后内皮修复中的作用尚不清楚。本研究拟观察LXRs激动剂T0901317对内皮细胞增殖的影响并探讨其分子机制，以初步阐明LXRs在血管内皮损伤修复中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

M199培养基、优质胎牛血清购自Gibco公司，内皮细胞生长支持物（endothelial cell growth supplements，ECGS）、LXRs激动剂T0901317、PI3K抑制剂LY294002购自Sigma公司，MTS细胞增殖试剂盒购自Promega公司，磷酸化Akt（Ser ^{473}）、Akt抗体购自Signalway Antibody公司，GAPDH抗体购自杭州贤至生物科技有限公司，ECL化学发光试剂盒购自Millipore公司。

1.2 人脐静脉内皮细胞（HUVEC）的分离培养及鉴定

按照本实验室前期的方法[7]，无菌条件下从健康新生儿脐带分离获得HUVEC，加入M199培养基（内含20%优质胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 μg/ml链霉素、10 U/ml肝素、2 mmol/L谷氨酰胺、75 μg/ml ECGS），重悬细胞，接种于包被有纤维连接蛋白（fibronectin）的一次性塑料培养瓶中，置于37 ℃、5% CO_2、饱和湿度孵箱中培养，24 h后换液，以后每2天换液1次。待细胞融合70%～80%后，按1∶2比例传代培养。免疫荧光法检测Ⅷ因子相关抗原（von Willebrand factor，vWF）并进行内皮细胞鉴定。实验用第3～5代细胞。

1.3 MTS法检测细胞增殖能力

参照文献[8]的方法，采用MTS细胞增殖试剂盒测定HUVEC的增殖能力。第3代的HUVEC培养至细胞融合度80%～90%时，胰蛋白酶消化细胞，制成密度约2×10^4/ml的细胞悬液，每孔100 μl接种于96孔板，每组分6个复孔，37 ℃、5% CO_2培养24 h，待细胞贴壁后换用无血清M199培养基同步化12 h后换回含血清和ECGS的培养基，分别加入不同浓度的LXRs激动剂T0901317（0、0.5、2、5 μmol/L），继续培养48 h后，每孔加入20 μl的MTS试剂，37 ℃、5% CO_2培养4 h，酶联免疫检测仪检测490 nm波长的光密度。当采用PI3K抑制剂LY294002干预时，LY294002（10 μmol/L）先于LXRs激动剂30 min加入待干预的细胞。

1.4 Western blot测定磷酸化Akt及总Akt的表达

参照文献[9]的方法。第3代的HUVEC培养至细胞融合度70%～80%后，换用基础M199培养基（内含2%优质胎牛血清、100 U/ml青霉素、100 U/ml链霉素、2 mmol/L谷氨酰胺），而后分别加入LY294002（10 μmol/L，需要时先于LXR激动剂30 min加入）和不同浓度的LXRs激动剂T0901317（0、0.5、2、5 μmol/L）进行干预，在不同时间点收取细胞，RIPA裂解液提取细胞总蛋白，BCA法测定蛋白浓度。10% SDS-PAGE电泳分离蛋白，每孔上样量30～40 μg，湿转法转移到PVDF上，含5% BSA的TBST室温下封闭1～2 h，一抗（p-Akt、Akt、GAPDH分别1∶800、1∶1 000、1∶500稀释）4 ℃过夜，TBST洗膜10 min×3次，二抗（1∶5 000稀释）室温1 h，TBST洗膜10 min×3次，ECL化学发光法显色、曝光。Quantity one图像分析系统进行蛋白条带灰度分析，测p-Akt和总Akt蛋白的电泳条带灰度积分，以二者比值代表相对表达量，分析结果。以上实验重复3次。

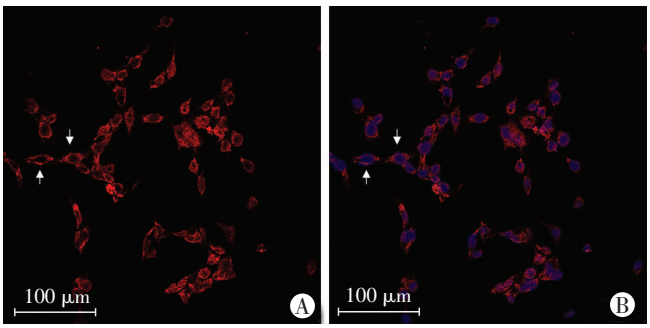
1.5 统计学分析

应用SPSS 18.0软件系统进行统计分析，结果以$\bar{x}\pm s$表示。组间差异性比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 HUVEC的鉴定

激光共聚焦显微镜下显示细胞质vWF阳性即为HUVEC，DPAI标记细胞核（蓝色荧光），鉴定阳性率>95%（图1）。



A：vWF；B：vWF+DAPI

图1 激光共聚焦显微镜观察鉴定HUVEC结果

2.2 LXRs激动剂T0901317增强HUVEC的增殖能力

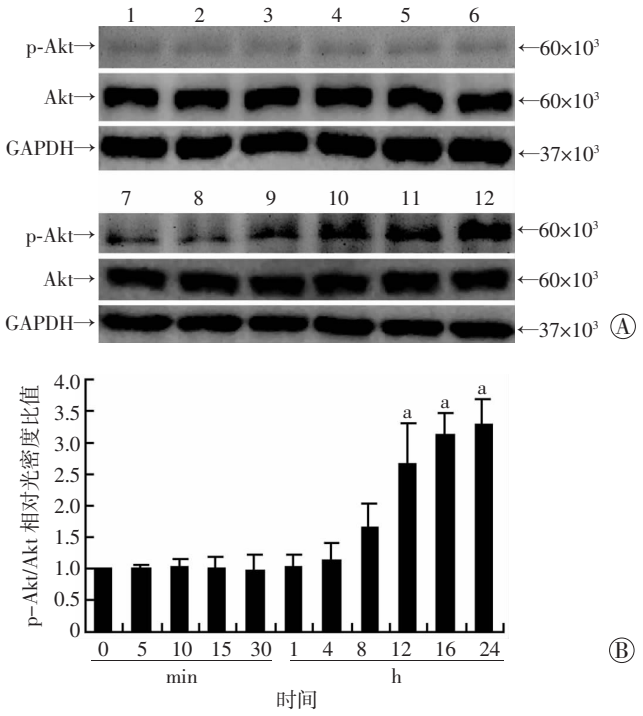
对照组和T0901317（0.5、2、5 μmol/L）处理组的D（490）分别为（0.486±0.032）、（0.571±0.028）、（0.563±0.020）、（0.536±0.018），提示T0901317能明显促进HUVEC的增殖（$P<0.05$，$P<0.01$），并呈一定的剂量依赖性。

2.3 LXRs激动剂T0901317激活HUVEC中PI3K/Akt信号通路

2.3.1 LXRs激动剂T0901317上调HUVEC中磷酸化Akt（Ser^{473}）的表达 T0901317（5 μmol/L）作用于HUVEC后，呈时间依赖的上调HUVEC中磷酸化Akt（Ser^{473}）（p-Akt-Ser^{473}）的表达，在12 h后可观察到明显的p-Akt-Ser^{473}表达上调（$P<0.01$）；然而在T0901317干预的早期（<1 h），未见明显的p-Akt-Ser^{473}水平上调，提示LXRs激动剂T0901317可能通过间接作用来上调HUVEC中p-Akt-Ser^{473}水平（图2）。

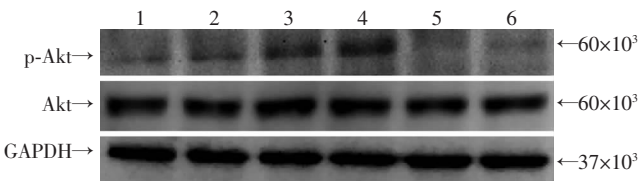
2.3.2 LXR激动剂T0901317通过转录调节激活HUVEC中PI3K/Akt信号通路 由图3可以看出，对照组和T0901317（0.5、2、5 μmol/L）处理组的p-Akt/Akt相对光密度比值分别为（1±0）、（1.958±0.334）、（2.554±0.325）、（3.014±0.327），提示T0901317呈剂量依赖的上调HUVEC中p-Akt-Ser^{473}的表达（$P<0.05$，$P<0.01$），这与T0901317增强HUVEC的增殖能力是一致的；而PI3K抑制剂LY294002（10 μmol/L）可以明显

阻断 T0901317 上调 p-Akt-Ser^{473}的作用[p-Akt/Akt 相对光密度比值:(1.091 ± 0.218) *vs* (3.014 ± 0.327), $P < 0.01$],提示 T0901317 通过 PI3K 激活了 HUVEC 中 Akt 信号通路。基因转录抑制剂放线菌素-D(actinomycin D,Act-D,5 μg/ml)可以明显阻断 T0901317 上调 p-Akt-Ser^{473}的作用[p-Akt/Akt 光密度比值:(0.985 ± 0.172) *vs* (3.014 ± 0.327), $P < 0.01$],说明 T0901317 通过基因转录调节的方式激活 HUVEC 中 PI3K/Akt 信号通路,这也解释了 T0901317 未能在早期(< 1 h)上调 HUVEC 中 Akt 的磷酸化水平。



A:T0901317(5 μmol/L)处理 HUVEC 不同时间点 p-Akt-Ser^{473}、Akt 的蛋白表达　1~12 分别为 0、5、10、15、30、60 min、0、4、8、12、16、24 h;B:定量分析结果　a:$P < 0.01$,与对照组(0 min)比较

图 2　LXR 激动剂 T0901317 时间依赖的上调 HUVEC 中 p-Akt-Ser^{473}的表达



1:对照组;2~4:分别为 T0901317 0.5、2、5 μmol/L;5:T0901317 (5 μmol/L) + LY294002 (10 μmol/L);6:T0901317 (5 μmol/L) + actinomycin-D (5 μg/ml)

图 3　LXR 激动剂 T0901317 通过基因转录调节激活 HUVEC 中 PI3K/Akt 信号通路

2.4　LXRs 激动剂 T0901317 通过 PI3K/Akt 促进 HUVEC 的增殖能力

采用 PI3K 抑制剂 LY294002 (10 μmol/L) 预处理后,T0901317(5 μmol/L)增强 HUVEC 增殖能力的效应明显减弱[D(490):(0.498 ± 0.035) *vs* (0.578 ± 0.028), $P < 0.01$],而 LY294002 并没有改变 HUVEC 的细胞活力[D(490):(0.486 ± 0.030) *vs* (0.495 ± 0.032), $P > 0.05$];提示 LXR 激动剂 T0901317 可以通过激活 PI3K/Akt 信号通路进而促进 HUVEC 的增殖能力。

3　讨论

LXRs 作为氧化型固醇激活的核受体,参与调节机体一系列生理和病理生理活动,包括胆固醇代谢、炎症反应、动脉粥样硬化发生、发展等[2-5]。然而,LXRs 在血管损伤后内皮修复中的作用尚不清楚。本实验中,我们发现 LXRs 激动剂 T0901317 可以剂量依赖的增强 HUVEC 的增殖能力。血管损伤后的再内皮化和内皮功能的恢复可以有效地防止脂质、炎性细胞的浸润和平滑肌细胞的增殖、迁移[1],因此我们推测 LXRs 激动剂导致的内皮细胞增殖可能参与了其防治新生内膜形成和动脉粥样硬化发生、发展的过程[5, 10]。

Akt,又称蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB),是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。PI3K/Akt 是重要的细胞生存信号[11],PI3K 激活后可导致 Akt-Ser^{473}位点磷酸化从而激活 Akt,活化的 Akt 通过磷酸化作用进一步激活或抑制其下游靶蛋白,进而发挥调节细胞的增殖、迁移和抗凋亡等作用[12]。最近研究表明,LXRs 激动剂 T0901317 可通过激活 PI3K/Akt 信号通路促进皮层神经元生长、轴突再生和增强突触可塑性[13]。因此,我们推测 T0901317 可能通过激活 PI3K/Akt 信号促进 HUVEC 的增殖。

我们发现,T0901317 呈时间和剂量依赖性上调 HUVEC中 p-Akt-Ser^{473}的表达,而 PI3K 抑制剂 LY294002 可以明显阻断 T0901317 上调 p-Akt-Ser^{473}的作用,提示 T0901317 通过 PI3K 激活了 HUVEC 中 Akt 信号通路。值得注意的是,T0901317 未能在早期(< 1 h)激活 HUVEC 中 PI3K/Akt 信号通路,前期研究证实核受体 PPAR-δ 可以通过基因转录的方式活化 PI3K/Akt 信号[14],因此我们推测核受体 LXRs 也可能是通过调节基因转录的方式活化了 PI3K/Akt 信号通路。采用基因转录抑制剂放线菌素-D 预处理后,T0901317 激活 PI3K/Akt 信号的作用被明显阻断,证实了上述假设。我们进一步验证 PI3K/Akt 信号通路是否参与 T0901317 调节 HUVEC 增殖的过程。在用 PI3K 抑制剂 LY294002 预处理后,T0901317 促进 HUVEC 增殖的作用被明显削弱,提示 LXRs 激动剂 T0901317 可以通过激活 PI3K/Akt 信号通路影响 HUVEC 增殖能力。

血管内皮细胞的增殖除了参与损伤血管的再内皮化,还可促进新生血管的形成,而血管生成对于缺血性疾病(如缺血性心脏病、脑卒中、糖尿病周围血管病变)等的防治有着重要意义。本研究通过体外实验证

实了 LXRs 的激动剂可能通过激活 PI3K/Akt 信号通路促进内皮细胞的增殖,推测其在上述疾病的防治方面可能有良好的应用前景[15]。进一步的实验需验证激活 LXRs 能否促进损伤血管的再内皮化以及由何种 LXRs 亚型参与,研究结果可能为血管损伤性疾病和缺血性疾病的防治提供新策略。

参考文献:

[1] Versari D, Lerman L O, Lerman A. The importance of reendothelialization after arterial injury[J]. Curr Pharm Des, 2007, 13(17): 1811-1824.

[2] 王强, 江渝. 肝 X 受体的研究进展[J]. 生理科学进展, 2009, 40(2): 147-150.

[3] Zelcer N, Tontonoz P. Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling[J]. J Clin Invest, 2006, 116(3): 607-614.

[4] 黄艳, 黄刚, 胡长江, 等. GW3965 在 Raji 细胞中对 BLyS 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(13): 1342-1345.

[5] Calkin A C, Tontonoz P. Liver x receptor signaling pathways and atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(8): 1513-1518.

[6] Zhu M, Fu Y, Hou Y, *et al*. Laminar shear stress regulates liver X receptor in vascular endothelial cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(3): 527-533.

[7] 郭文昀, 宋耀明, 黄岚, 等. 脂联素对 TNF-α 诱导的人脐静脉内皮细胞黏附因子 mRNA 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(19): 1876-1880.

[8] Ii M, Takeshita K, Ibusuki K, *et al*. Notch signaling regulates endothelial progenitor cell activity during recovery from arterial injury in hypercholesterolemic mice[J]. Circulation, 2010, 121(9): 1104-1112.

[9] Yu S, Wong S L, Lau C W, *et al*. Oxidized LDL at low concentration promotes *in-vitro* angiogenesis and activates nitric oxide synthase through PI3K/Akt/eNOS pathway in human coronary artery endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 407(1): 44-48.

[10] Blaschke F, Leppanen O, Takata Y, *et al*. Liver X receptor agonists suppress vascular smooth muscle cell proliferation and inhibit neointima formation in balloon-injured rat carotid arteries[J]. Circ Res, 2004, 95(12): e110-e123.

[11] Manning B D, Cantley L C. AKT/PKB signaling: navigating downstream[J]. Cell, 2007, 129(7): 1261-1274.

[12] 宋华培, 黄跃生, 党永明, 等. PI3K/Akt 信号途径抑制烧伤后大鼠缺血缺氧心肌细胞凋亡[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(1): 52-55.

[13] Chen J, Zacharek A, Cui X, *et al*. Treatment of stroke with a synthetic liver X receptor agonist, TO901317, promotes synaptic plasticity and axonal regeneration in mice[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(1): 102-109.

[14] Han J K, Lee H S, Yang H M, *et al*. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta agonist enhances vasculogenesis by regulating endothelial progenitor cells through genomic and nongenomic activations of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway[J]. Circulation, 2008, 118(10): 1021-1033.

[15] Sironi L, Mitro N, Cimino M, *et al*. Treatment with LXR agonists after focal cerebral ischemia prevents brain damage[J]. FEBS Lett, 2008, 582(23/24): 3396-3400.

(收稿:2011-11-06;修回:2011-12-28)

(编辑 栾 嘉)

(上接472页)

2 讨论

板栗刺伤所致的眼部外伤在每年秋季板栗收获季节时有发生,板栗采摘时,栗苞从高处坠落击伤眼部,容易穿透角膜、进入前房、刺伤虹膜或晶状体,如果不能及时就诊或处理不当,可能导致角膜感染、大泡性角膜病变、外伤性白内障甚至眼内感染等严重的并发症。

生理情况下角膜内皮细胞对维持角膜透明有重要作用。一是角膜内皮细胞之间为紧密的缝隙连结,具有良好的屏障作用,二是角膜内皮有主动液泵功能[1]。板栗刺为一种植物,损伤角膜后,一方面板栗刺上的真菌可引起真菌性角膜炎,另一方面,刺入角膜和前房、虹膜的板栗刺所带的毒素可对包括角膜内皮在内的角膜和虹膜组织等造成严重的毒性反应。本例患者伤后没有发生真菌性角膜炎,而出现大的疱性角膜炎,发病原因可能主要是板栗刺的毒素对角膜内皮细胞的损伤所致。

对于角膜浅层的板栗刺,手术剔除方法为:①裂隙灯显微镜下摘出异物:1%地卡因表面麻醉。用一次性 30G 针头向外挑拨并剔出,多枚板栗刺无法一次剔完可分次剔出。②对于角膜深层的板栗刺,如果角膜尚透明,术前充分缩瞳,板层切开角膜取出异物,对大部分进入前房的角膜深层栗刺异物,在邻近板栗刺的角膜缘切开进入前房,注入粘弹剂保持前房深度。对完全进入前房的栗刺,用显微平镊伸入前房夹持栗刺摘出。已有虹膜前粘连的栗刺,用针头小心拨动栗刺,使其与虹膜表面分离,然后用7号抽吸针头对准栗刺水平位抽吸进针管后取出[2]。术后应用抗菌素和糖皮质激素控制炎症,促进角膜修复,同时应考虑加用抗真菌的药物[3]。本例患者入院后拟待角膜情况好转后择期行手术取出异物,患者要求出院,嘱患者随访。

为预防板栗刺致眼外伤,应加强预防教育,收获板栗时建议劳动者佩戴防护镜和戴草帽,尽量避免仰视,而树上有人摇晃时尤为注意,一旦发生应及时就诊。患者一旦就诊,医师应在裂隙灯下仔细检查,对板栗刺的位置、数量及眼部损伤情况做出综合评估,如不具备诊疗设施及操作技能应及早将患者转诊上级医院,避免因剔取异物不当而增加患者痛苦,加重角膜损伤,加大再次剔取板栗刺的难度。

参考文献:

[1] 谢立信,史伟云. 角膜病学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2007: 55.

[2] 邬可为, 葛章强, 蒋瑛. 角膜深层栗刺异物的手术治疗[J]. 眼外伤职业眼病杂志, 2005, 27(1): 51-52.

[3] 黄雄兰. 板栗刺性角膜异物并发真菌性角膜溃疡治疗体会[J]. 微创医学, 2009, 4(1): 74-75.

(收稿:2011-12-13;修回:2012-01-09)

(编辑 张 维)