基础研究 文章编号:0253-3626(2011)06-0818-04

氯化锂调节趋化因子 Fractalkine 表达抑制缺氧复氧诱导的血管内皮细胞损伤

殷 菱,李法琦
(重庆医科大学附属第一医院老年科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察缺氧复氧诱导人脐静脉血管内皮细胞(Human umbillcal vein endothelial cells,HUVECs)损伤和趋化因子(Fractalkine,FKN)表达变化及氯化锂(Lithium chloride,LiCl)的干预效应。方法:体外培养 HUVECs 并随机分为对照组、缺氧复氧组和 LiCl 5、10 mmol/L 组。MTT 法测定 HUVECs 的存活率,流式细胞术检测 HUVECs 凋亡率,免疫细胞荧光技术检测 HUVECs的 FKN 蛋白表达,RT-PCR 技术检测 HUVECs 的 FKN mRNA 表达。结果:与对照组比较,缺氧复氧组 HUVECs 存活率显著降低但凋亡率显著增高($P<0.01$)且 FKN mRNA 和蛋白质表达也显著增高($P<0.01$);与缺氧复氧组比较,LiCl 5、10 mmol/L 组 HUVECs 存活率显著增高但凋亡率显著降低($P<0.01$)且 FKNmRNA 和蛋白质表达也明显降低($P<0.05$)。结论:缺氧复氧上调 FKN 表达诱导 HUVECs 损伤(存活率降低、凋亡率增加);LiCl 预处理能够下调 FKN 表达,显著减轻缺氧复氧导致的 HUVECs 损伤。

【关键词】缺氧复氧;内皮细胞;细胞凋亡;趋化因子;氯化锂
【中国图书分类法分类号】R543.6 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-28

The cytoprotective effects of Lithium chloride on HUVECs through regulating fractalkine during the anoxia/reoxygenation

YIN Ling, LI Fa-qi
(*Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the cytoprotective effects of lithium chloride (LiCl) on human umbillcal vein endothelial cells (HUVECs) through regulating Fractalkine (FKN) during the anoxia/reoxygenation. *Methods*: HUVECs were cultivated and divided into four groups randomly (control group, anoxia/reoxygenation group, LiCl 5 mmol/L group, and LiCl 10 mmol/L group), which were used to establish the anoxia/reoxygenation models. The cell viability was detected by MTT method. The apoptosis rate of HUVECs was examined by Flow cytometry. The mRNA expression of FKN was assessed by RT-PCR. The intracellular distribution and expression of FKN were determined by immunofluorescent staining. *Results*: Compared with control group, the apoptotic rate of HUVECs increased but their viability rate reduced significantly in anoxia/reoxygenation group (all $P<0.01$). The mRNA and protein expression of FKN were increased remarkably in anoxia/reoxygenation group compared to control group ($P<0.01$). Compared with anoxia/reoxygenation group, the survival rate of HUVECs was increased but their apoptotic rate as well as the expression of FKN mRNA and FKN protein reduced significantly in LiCl 5 mmol/L and 10 mmol/L groups ($P<0.01$ or $P<0.05$). *Conclusions*: The anoxia/reoxygenation induced the damage of HUVECs through upregulating FKN expression. LiCl pretreatment can protect HUVECs against anoxia/reoxygenation injury via inhibiting FKN expression.

【Key words】 anoxia/reoxygenation; endothelial cell; apoptosis; fractalkine; lithium chloride

血管内皮细胞的大量凋亡及过度炎症反应是心肌缺血再灌注(Ischemia reperfusion,I/R)损伤的重要原因,参与了心肌 I/R 损伤的病理生理过程。最初,锂盐作为抗抑郁-躁狂症的主要药物而应用于临床。近年研究发现锂盐的作用不仅如此,锂盐能增强神经前祖细胞的增殖和分化,氯化锂(Lithium chloride,LiCl)预处理可通过下调核转录因子 κB 蛋白的表达而减轻大鼠脑出血后的炎症反应,减少脑出血后血肿周围神经细胞凋亡。同时,LiCl 在 I/R 损伤方面的作用也越来越被研究者所重视[1-3]。而在 I/R 损伤中与趋化因子(Fractalkine,FKN)关系的研究国内外未见报道。本实验通过培养人脐静脉血管内皮细胞(Human umbillcal vein endothelial cells,HUVECs)缺氧复氧模型模拟在体 I/R 损伤,观察缺氧复氧是否诱导 HUVECs 表达 FKN 从而导致 HUVECs 损伤及 LiCl 预处理的干预效应,探讨 LiCl 对内皮细胞缺氧复氧损伤的保护作用及其可能机制。

作者介绍:殷 菱(1979-),女,硕士,
研究方向:老年心血管疾病的基础与临床研究。
通信作者:李法琦,男,教授,Email: faqili_2006@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 细胞株

HUVECs 为重庆医科大学超声医学工程研究所惠赠。

1.2 主要试剂

优级胎牛血清(杭州四季青公司)；H-DMEM 培养基(Hyclone)；Fractalkine (FKN) (C-18)多克隆抗体(Santa Cruz)；FITC-IgG(北京中衫)；RNA 抽提试剂、逆转录试剂、PCR 试剂盒(TaKaRa)；LiCl(上海生工)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 HUVECs于10%胎牛血清(FBS)的H-DMEM培养液中、37℃、5%CO_2 培养箱培养。1~2 d 更换新鲜培养液，每周按 1:3 比例传代 1 次(0.25%胰酶消化)。待培养细胞生长至 80%左右加药(LiCl)处理，共培养 72 h 后缺氧。每次实验均采用第 3 代细胞，用不同批次的细胞重复实验。

1.3.2 HUVECs 缺氧/复氧模型建立 所用缺氧箱为美国 Thermo 生产的仪器型号为 Forma3131 的三气培养箱。缺氧前，启动培养箱，同时分别通入纯 N_2 和 CO_2 气体。培养条件：温度为 37℃，高限 38.5℃；CO_2 浓度为 5%；O_2 浓度为 1%。待培养箱达到预设条件，即可进行缺氧培养。按实验要求，用预热 37℃过滤除菌的无糖 D-Hanks 液将培养瓶或板中的细胞洗 3 遍后，加入无糖 D-Hanks 液(缺氧液)，迅速打开缺氧培养箱门，放入培养瓶或板后立即关闭箱门；待温度、CO_2 浓度、O_2 浓度重新达到 37℃、5%、1%时开始计时缺氧时间。缺氧过程中避免再次打开培养箱门。缺氧 3 h 后取出培养瓶或培养板，将无糖 D-Hanks 液换掉，加入 H-DMEM+10%胎牛血清(FBS)完全培养液(复氧液)，重新放入 37℃、5%CO_2 培养箱给予不同时间复氧。糖氧剥夺模拟缺血缺氧，复氧复糖模拟再灌注。

1.3.3 MTT 法测定细胞存活率 计算公式：细胞存活率=实验组吸光度值/对照组吸光度值×100%。将单细胞悬液以每孔 5×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔培养板(取 6 个时间点即未缺氧，复氧 0、0.5、1、2、3 h)，每孔 200 μl，细胞贴壁后，干预组加入 LiCl，使其终浓度分别达到 5、10、20 mmol/L，另设调零孔和阴性对照孔，每组设 5 个复孔，72 h 后缺氧复氧操作，按设计复氧时间点，取出相应培养板，每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μl，孵育 4 h，弃上清，每孔再加入 150 μl 二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide，DMSO)，振荡 15 min，在高通量多功能微板测试系统 490 nm 波长处测得各孔吸光度(A)值。实验重复 3 次。

1.3.4 流式细胞术检测细胞凋亡 计算公式：细胞凋亡率=[(晚期凋亡数+早期凋亡数)/(细胞总数-坏死细胞数)]×100%。分对照组、缺氧复氧组、10 mmol/L LiCl 组，后 2 组取复氧 0、2 h 2 个时间点。缺氧复氧后，在相应时间点取出对应 25 ml 培养瓶，胰酶消化离心后，PBS 重悬，再次离心、PBS 重悬后，用 Annexin-V-PI 双染法结合 PS 检测细胞凋亡。实验重复 3 次。

1.3.5 RT-PCR 检测 FKN mRNA 的表达 细胞分组同流式，复氧时间点同 MTT。根据 Tri Reagent 说明书提取细胞总 RNA，测 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.0 之间。二步法 RT-PCR 检测 FKN 的 mRNA，以 β-actin 为内参。具体序列见表 1。

反应条件：94℃变性 3 min，94℃ 30 s，61℃退火 30 s，72℃ 30 s，72℃延伸 5 min，共 35 个循环。采用凝胶成像分析系统，对 RT-PCR 产物的电泳条带进行密度扫描，光密度扫描半定量计算 FKN/β-actin，实验重复 3 次。

1.3.6 免疫细胞荧光检测 FKN 表达 ①细胞爬片制备。接种细胞于预先放置无菌小盖玻片的 24 孔板中，细胞分组和复氧时间点同 RT-PCR，缺氧复氧后，在各时间点取出对应培养板，PBS 洗 5 min×3 次，经 4%多聚甲醛固定 1 h，取出盖玻片，PBS 洗 5 min×3 次，备用。②染色。0.1%TritonX-100 打孔，PBS 洗 5 min×3 次；血清 37℃封闭 30 min；加一抗 FKN(1:50)，湿盒 4℃过夜；PBS 洗 5 min×3 次，滴加相应二抗(1:50)，37℃避光反应 1 h，PBS 洗 5 min×3 次，激光共聚焦显微镜下观察并采集图像。

1.4 统计学分析

所有实验结果计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，应用 SPSS16.0 软件进行分析，多个样本均数比较采用重复测量数据的方差分析，组间两两比较采用 LSD 比较；各时间段的组间比较采用单因素方差分析。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HUVECs 存活率的变化

以正常对照组吸光度为存活率 100%，将各组所得结果通过公式换算成细胞存活率(表 2)。与正常对照组相比，缺氧 3 h 后复氧各时间点细胞存活率均降低，同时随着复氧时间的延长，细胞存活率逐渐降低；LiCl 5 mmol/L、10 mmol/L 预处理 3 d 能够提高缺氧后细胞的存活率，而以后者效果更为显著。LiCl 20 mmol/L 组，与缺氧复氧组相比，细胞存活率明显下降，虽然具有统计学意义($P<0.01$)，但是考虑引起该结果应为细胞渗透压过高造成细胞的大量死亡，该组细胞在复氧各时间点，存活率均低于 70%，无法继续用于后继实验，舍弃。在后继的实验中，我们均采用 LiCl 10 mmol/L 为干预浓度(效果最好)。

2.2 HUVECs 凋亡率的变化

与正常对照相比，缺氧复氧促进细胞凋亡，随复氧时间延长，凋亡率增加($P<0.01$)，与缺氧复氧组相比，LiCl 10 mmol/L 预处理降低 HUVECs 凋亡率($P<0.01$)。结果示预处理降低 HUVECs 凋亡率。见表 3。

表 1 引物序列及产物的长度

基因	正义链	反义链	产物长度	退火温度
Fkn	5'-CCGAAGGAGCAATGGGTCAA-3'	5'-AGACGGGAGGCACTCGGAAA-3'	346	61℃
β-actin	5'-CTGGGACGACATGGAGAAAA-3'	5'-AAGGAAGGCTGGAAGAGTGC-3'	564	59.4℃

表 2　HUVECs 缺氧 3 h 后不同复氧时间点的细胞存活率（$\bar{x}\pm s$, n=3）

组别	正常对照组	复氧 0 h（复氧即刻）	复氧 0.5 h	复氧 1 h	复氧 2 h	复氧 3 h
正常对照组	98.93 ± 0.60	–	–	–	–	–
缺氧复氧组	–	84.69 ± 0.53	80.93 ± 1.34	74.89 ± 1.95	66.46 ± 2.98	57.83 ± 3.91
LiCl 5 mmol/L 组	–	86.39 ± 1.25	83.35 ± 2.22[a]	77.08 ± 1.41[a]	73.33 ± 1.34[a]	64.11 ± 2.60[a]
LiCl 10 mmol/L 组	–	86.89 ± 2.43[a]	84.05 ± 2.67[a]	81.55 ± 0.37[ab]	78.31 ± 1.26[ab]	72.47 ± 3.25[ab]
LiCl 20 mmol/L 组	–	68.45 ± 2.81	53.37 ± 0.40	49.46 ± 1.41	46.33 ± 2.46	35.96 ± 1.75

注：[细胞存活率 = 实验组吸光度值/对照组吸光度值 × 100%]。与正常对照组相比，缺氧复氧组，在复氧各时间点 P<0.05（未标出）；与缺氧复氧组相比，LiCl 5、10 mmol/L 组，在复氧的各时间点，a，P<0.05；与 LiCl 5 mmol/L 组比较，LiCl 10 mmol/L 组，b，P<0.05；LiCl 20 mmol/L 组，与前面 4 组相比，在复氧的各时间点，P<0.01（未标出）；复氧各时间点两两比较，P<0.05（未标出）

表 3　HUVECs 缺氧 3 h 后缺氧复氧组和 LiCl 10 mmol/L 组在复氧即刻和复氧 2 h 细胞凋亡情况（$\bar{x}\pm s$, n=3）

组别	正常对照组	复氧 0 h（复氧即刻）	复氧 2 h
正常对照组	2.48 ± 0.73	–	–
缺氧复氧组	–	15.82 ± 4.47[a]	31.32 ± 5.42[a]
LiCl 10 mmol/L 组	–	8.55 ± 1.12[ab]	20.42 ± 0.90[ab]

注：与正常对照组相比，缺氧复氧组、LiCl 10 mmol/L 组，在复氧即刻、复氧 2 h，a，P<0.01；与缺氧复氧组相比，LiCl 10 mmol/L 组，b，P<0.01

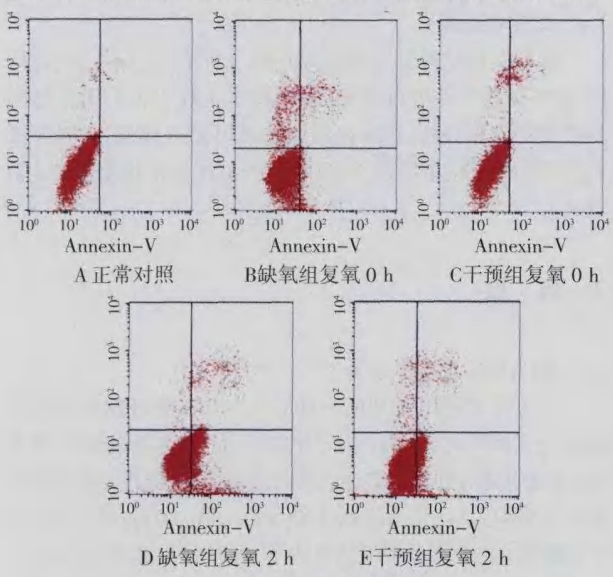


图 1　流式细胞仪检测图

2.3　HUVECs FKNmRNA 表达的变化

与正常对照组比：缺氧复氧促进内皮细胞表达 FKN mRNA，于复氧 1 h 达表达高峰，尽管数据显示复氧 2 h 比复氧 1 h 低，但无统计学意义（P>0.05）；与缺氧复氧组比较，LiCl 10 mmol/L 干预后，在各个复氧时间点，FKN mRNA 表达相对减弱（P<0.05）（图 2、表 4）。

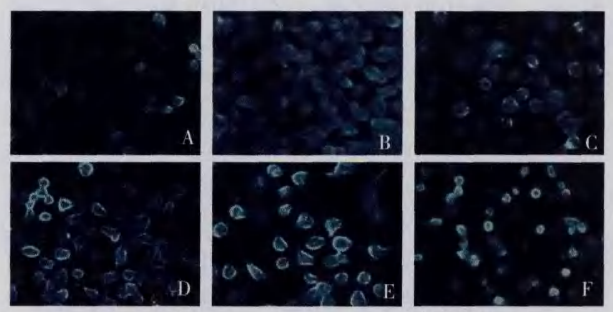
2.4　HUVECs FKN 蛋白表达的变化

正常对照组 HUVECs 胞膜及胞浆中荧光信号弱，随复氧时间延长，胞膜荧光信号增加，表达荧光的细胞数目在同一视野下也逐渐增多，于复氧 2 h 荧光信号最强，而胞浆中荧光表达弱且无明显变化。与缺氧复氧组相比，LiCl 10 mmol/L 组降低胞膜荧光强度。随复氧时间延长，细胞密度减小，体积变小（图 3，表 5）。



1~6. 分别代表正常对照、复氧 0 h、复氧 0.5 h、复氧 1 h、复氧 2 h、复氧 3 h 6 个时间点；346 bp 代表 FKN；564 bp 代表 β-actin

图 2　FKN mRNA 电泳图



A. 正常对照；B、C、D、E、F 分别为缺氧复氧组细胞在复氧 0、0.5、1、2、3 h 的细胞荧光照片

图 3　荧光示 FKN 的表达（×100）

3　讨　论

早期，LiCl 主要是用于治疗燥狂和抑郁症的临床药物，在治疗的过程中人们逐渐发现，LiCl 治疗疾病的作用机制主要涉及如下几个方面：①阻断磷脂酰肌醇循环；②直接抑制

表 4　HUVECs 缺氧 3 h 后各设定复氧时间点测得的 FKN mRNA 表达值（$\bar{x}\pm s$, n=3）

组别	正常对照组	复氧 0 h	复氧 0.5 h	复氧 1 h	复氧 2 h	复氧 3 h
正常对照组	0.985 ± 0.068	–	–	–	–	–
缺氧复氧组	–	1.141 ± 0.299[a]	1.488 ± 0.736[a]	1.778 ± 0.969[a]	1.690 ± 0.104[a]	1.190 ± 0.104[a]
LiCl 10 mmol/L 组	–	1.141 ± 0.299[b]	1.267 ± 0.583[ab]	1.654 ± 0.066[ab]	1.576 ± 0.541[ab]	1.054 ± 0.066[b]

注：与对照组相比，a，P<0.05；与缺氧复氧组比较，b，P<0.05

表 5 HUVECs 缺氧 3h 后各设定复氧时间点测得的 FKN 蛋白荧光半定量表达（$\bar{x} \pm s$, $n=5$）

组别	正常对照组	复氧 0 h	复氧 0.5 h	复氧 1 h	复氧 2 h	复氧 3 h
正常对照组	0.076 ± 0.013	–	–	–	–	–
缺氧复氧组	–	0.275 ± 0.030[a]	0.722 ± 0.086[a]	1.076 ± 0.095[a]	1.244 ± 0.076[a]	1.014 ± 0.140[a]
LiCl 10 mmol/L 组	–	0.106 ± 0.021[ab]	0.372 ± 0.215[ab]	0.618 ± 0.119[ab]	0.919 ± 0.115[ab]	0.759 ± 0.128[ab]

注：与对照组相比，a，$P<0.05$；与缺氧复氧组比较，b，$P<0.05$

糖原合成酶-3βGSK-3β 而活化 Wnt 信号途径；③降低去甲肾上腺素的活性，增加 5-羟色胺的释放；④锂提高谷氨酸转运体的功能等。研究表明在肝癌细胞、原代培养的牛主动脉内皮细胞中，LiCl 能使细胞阻滞于 G/M 期进而抑制细胞生长，此作用在一定范围内呈剂量效应关系。然而，对细胞生长和细胞周期进展的影响可能随细胞类型的不同而不同[4]。体外、体内实验研究均发现了锂盐能抑制各种原因引起的神经细胞凋亡，但其确切机制却未阐明[5]。而在 I/R 损伤中，与 FKN 关系的研究国内外尚未见报道。本实验结果表明，锂能够对抗缺氧复氧损伤抑制内皮细胞凋亡可能与 FKN 参与的某个调节通路相关联。

血管内皮细胞的大量凋亡及过度炎症反应是心肌缺血再灌注损伤的重要原因，伴随心肌缺血再灌注损伤的整个病理生理过程。炎症过程中，白细胞粘附、穿越血管内皮细胞向炎症部位移行的分子基础是趋化因子的募集，趋化因子及白细胞是心肌局部缺血级联反应的起始原因之一[6]；那么，作为趋化因子的一员，FKN 理应参与了 I/R；有研究表明，I/R 可促使大鼠心肌组织表达 FKN[7]。那么在 I/R 损伤中，FKN 的表达与细胞凋亡之间是否存在相关性？国内外均未见报道，也是本实验想要初步探讨的问题。本实验以缺氧复氧诱导细胞凋亡作为初始模型，LiCl 作为抑制细胞凋亡的物质，研究 FKN 在 LiCl 抑制缺氧复氧诱导内皮细胞凋亡中的作用。

本实验发现，缺氧复氧使 HUVECs 存活率降低，凋亡率增加，随复氧时间延长损伤加剧，而在一定浓度范围内，LiCl 预处理能减轻上述反应，随复氧时间延长保护作用更显著；同时，缺氧复氧的确促使 HUVECs 表达 FKN，且荧光信号主要定位在细胞膜上。但 FKNmRNA 表达高峰与荧光 FKN 表达高峰有时间上的错位，这是因为真核生物在细胞核中转录形成 RNA 前体，剪接后形成成熟 mRNA，成熟 mRNA 由核孔转运出核外，结合核糖体进行翻译，然后形成蛋白质，理论上蛋白表达延后于 mRNA 表达，故本实验结果与之更相符；同时，在损伤 HUVECs，趋化因子 FKN 的表达，使其更易与白细胞结合并趋化白细胞的迁移，复氧后 2 h FKN 达表达最高值，说明复氧后 2 h 可能是趋化白细胞的高峰时间，也是心肌 I/R 损伤的高峰时段，这也与临床表现相符。随复氧时间延长，细胞密度降低、体积变小，这与损伤引起细胞脱壁逐渐增多和凋亡时细胞固缩相关；但是在同一视野中，发现体积小的细胞荧光信号表达比其他细胞强，这是否说明细胞凋亡与 FKN 表达存在某种联系？或者是否可以说凋亡才是促使细胞表达 FKN 的直接原因？如果是，我们不妨做如下假设：在调节凋亡的某通路中，凋亡可通过某途经影响FKN的表达，而 LiCl 可调节特定物质的活性来影响凋亡通路及后续 FKN 的表达，那么我们就不难理解本实验中的各种变化现象以及 LiCl 的保护作用，但是这需要我们在后续的研究中收集更多、更有力的证据来证实；不过，众多研究表明，在相关的信号传导途经中，与 LiCl 关系最密切的应该是 GSK-3β[8]，这也应该是解决问题的最关键因素所在。

血管内皮细胞损伤是临床多种心血管疾病的共同病理生理改变，是动脉粥样硬化的重要环节；内皮细胞由于大量凋亡及过度炎症反应引起的血管结构和功能异常是构成 I/R 早期损伤的病理生理基础；故有效保护血管内皮细胞是预防和治疗心血管疾病的关键。研究发现，LiCl 通过降低 HUVECs 凋亡率及抑制 FKN 的表达起到保护作用，具体机制有待进一步研究，推测与 GSK-3β 的活性被抑制有关。我们相信，通过对损伤内皮细胞的深入研究，将来对 I/R 损伤的病因及临床治疗方面均会有一个新的见解。

参 考 文 献

[1] 张远恒，马业新.氯化锂对大鼠缺血再灌注损伤心肌细胞凋亡的影响[J].临床心血管病杂志，2009，25（6）：468-471.

[2] 刘安明，买荣康，蔡望青，等.氯化锂预处理对脑出血后血肿周围神经细胞凋亡及核因子 κB 表达的抑制作用[J].中华神经医学杂志，2009，8（8）：798-801，809.

[3] Dobaczewski M，Gonzalez-Quesada C，Frangogiannis N G.The extracellular matrix as a modulator of the inflammatory and reparative response following myocardial infarction[J]. J Mol Cell Cardiol，2010，48(3)：504-511.

[4] 李 琨，王海生.氯化锂对 MGC803 细胞增殖及细胞周期的影响[J].科学技术与工程，2009，9（17）：5105-5108.

[5] Manceur A P，Driscoll B D，Sun W，et al.Selective enhancement of the uptake and bioactivity of a TAT-conjugated peptide inhibitor of glycogen synthase kinase-3[J].Mol Ther，2009，17：500-507.

[6] Dobaczewski M，Xia Y，Bujak M，et al.CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart，mediating recruitment of regulatory T cells[J].Am J Pathol，2010，176（5）：2177-2187.

[7] 潘迪光，李志梁，刘映峰，等.辛伐他汀对缺血再灌注大鼠趋化因子 FKN 及其受体 CX3CR1 的影响[J].广西医科大学学报，2008，25（1）：96-98.

[8] Du W J，Li J K，Wang Q Y，et al.Lithium chloride preconditioning optimizes skeletal myoblast functions for cellular cardiomyoplasty in vitro via glycogen synthase kinase-3beta/beta-catenin signaling[J].Cells Tissues Organs，2009，190（1）：11-19.

（责任编辑：冉明会）