

低氧对大鼠肺动脉平滑肌细胞和肺微血管内皮细胞表达及分泌 fractalkine 的影响*

陈小菊¹, 程德云^{2△}, 樊莉莉²

1. 川北医学院附属医院 呼吸内科(南充 637000); 2. 四川大学华西医院 呼吸内科(成都 610041)

【摘要】 目的 观察低氧对培养的大鼠肺动脉平滑肌细胞和肺微血管内皮细胞表达及分泌 fractalkine(FKN)的影响。方法 低氧处理体外培养的大鼠肺动脉平滑肌细胞和肺微血管内皮细胞 12 h、24 h 和 48 h,采用原位杂交和免疫组化法检测细胞中 FKN mRNA 和蛋白的表达,酶联免疫法检测细胞上清液中 FKN 的浓度。结果 ①与对照组比较,大鼠肺动脉平滑肌细胞在低氧处理 12 h 后,其 FKN mRNA 和蛋白表达、细胞上清液中 FKN 浓度无明显变化($P>0.05$),低氧 24 h 后 FKN mRNA 和蛋白表达、细胞上清液中 FKN 浓度均增加($P<0.05$),48 h 后其增加则更加明显($P<0.01$)。②大鼠肺微血管内皮细胞在低氧处理 12 h、24 h 和 48 h 后,其 FKN mRNA 和蛋白表达及细胞上清液中 FKN 浓度与对照组比较均无明显变化($P>0.05$)。结论 低氧刺激增加了大鼠肺动脉平滑肌细胞表达和分泌 FKN。

【关键词】 低氧 Fractalkine 肺动脉平滑肌细胞 肺微血管内皮细胞

Effect of Hypoxia on the Expression and Production of Fractalkine in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells and Pulmonary Microvascular Endothelial Cells CHEN Xiao-ju¹, CHENG De-yun^{2△}, FAN Li-li². 1. Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, China; 2. Department of Respiratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China
△ Corresponding author, E-mail: cxj9592@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of hypoxia on the expression and production of fractalkine (FKN) in cultured rat pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCS) and pulmonary microvascular endothelial cells (PMVECS). **Methods** PASMCS and PMVECS from SD rat were cultured *in vitro*, and were exposed to hypoxia for 12 h, 24 h and 48 h. The expressions of fractalkine mRNA and protein in PASMCS and PMVECS were measured by the methods of *in situ* hybridization and immunohistochemistry. The fractalkine concentrations in supernatant fluid of cultured PASMCS and PMVECS were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** ① Compared with the control group, the expression and production of fractalkine in PASMCS did not increase after the treatment of hypoxia for 12 hours ($P>0.05$), but increased after being treated with hypoxia for 24 hours ($P<0.05$), and became more significant after 48 hours ($P<0.01$). ② Compared with the control group, there were no differences of FKN concentrations in supernatant fluid of PMVECS, FKN mRNA and protein levels in PMVECS after being treated with hypoxia for 12 hours, 24 hours or 48 hours ($P>0.05$). **Conclusion** Hypoxia stimulates the synthesis and secretion of fractalkine in cultured rat PASMCS.

【Key words】 Hypoxia Fractalkine Pulmonary artery smooth muscle cells Pulmonary microvascular endothelial cells

Fractalkine(FKN)是新近发现的具有趋化和黏附双重作用的趋化因子,其不仅对 T 细胞、单核细胞有强力的趋化活性,而且还能介导 T 细胞、单核细胞和自然杀伤(NK)细胞与血管内皮紧密黏附,导致内皮细胞受损及内皮功能不良^[1,2]。研究显示,FKN 主要表达在内皮细胞和上皮细胞中^[3],我们在动物实验中亦证实了 FKN 可以在大鼠肺动脉内皮细胞中表达,同时,我们首次发现,FKN mRNA

和蛋白也表达在大鼠肺动脉平滑肌细胞中^[4]。本研究采用低氧处理离体培养的大鼠肺动脉平滑肌细胞和肺微血管内皮细胞,观察不同低氧时间两种细胞表达 FKN mRNA 和蛋白的变化及细胞上清液中 FKN 浓度的变化,以探讨低氧对离体培养的大鼠肺动脉平滑肌细胞、肺微血管内皮细胞合成和分泌 FKN 的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

250 g 和 100 g SD 大鼠各 1 只,由四川大学实

* 国家自然科学基金(No. 30370629)资助

△ 通讯作者, E-mail: cxj9592@163.com

验动物中心提供。DMEM 培养基和胎牛血清(美国 Gibco),胰蛋白酶(美国 Sigma),I 型胶原酶(美国 Gibco),FKN 羊抗鼠多克隆抗体和 FKN ELISA 试剂盒(美国 R&D Systems),SP 试剂盒(北京中杉),FKN 寡核苷酸探针(上海生能),地高辛标记的探针检测试剂盒、 α -SM-actin 抗体和 CD31 抗体(武汉博士德)。平滑肌细胞消化液 I:胰蛋白酶 3 mg 和 I 型胶原酶 2 mg,加入 2 mL D-Hanks 液中配成溶液;平滑肌细胞消化液 II:I 型胶原酶 4 mg 加入 2 mL 含 10%胎牛血清的 DMEM 中配成溶液。

1.2 方法

1.2.1 大鼠肺动脉平滑肌细胞培养 将 250 g SD 大鼠用 10%水合氯醛 1 mL 麻醉。在无菌条件下,开胸取肺并分离出肺动脉主干及二、三级肺内动脉。剪碎肺动脉条(约 1 mm×1 mm 大小),将其置于平滑肌细胞消化液 I 中,37 °C 温孵 10~15 min,立即加入含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基 3 mL 终止消化,离心(1000 r/min,10 min),静置片刻,见絮状外膜浮起。去上清,将沉淀置于平滑肌消化液 II 中,37 °C 温箱消化 17 h 左右,离心(1000 r/min,10 min),去上清,用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液悬浮沉淀并接种于培养瓶中,置 37 °C、5%CO₂ 细胞培养箱内静置培养。6~8 d 后细胞完全融合,出现“峰-谷”结构后传代。用 α -SM-actin 抗体(常规免疫组化染色方法)鉴定血管平滑肌细胞的表型标志,胞浆棕黄色为阳性(图 1)。

1.2.2 大鼠肺微血管内皮细胞培养 取 100 g SD 大鼠 1 只,腹腔注射肝素钠 3000 U,同时予 10%水合氯醛 0.5 mL 腹腔注射麻醉。无菌条件下取出心肺组织,切取周边不含大中血管的肺组织,将其切割至 1 mm×1 mm 左右大小的组织块。将肺组织块均匀种于 25 mm×75 mm 培养瓶中,15~20 块/瓶。每块肺组织滴少许含 20%胎牛血清的 DMEM,刚好将整个组织块浸润,然后将培养瓶置 37 °C、5%CO₂ 细胞培养箱内静置培养。分别于 24 h、48 h 后吸出培养瓶内原有 DMEM 培养液,重新加入含 20%胎牛血清的 DMEM,60 h 后,弃去组织块,继续培养,倒置显微镜下观察细胞生长、贴壁情况。15 d 后细胞长成单层致密层,即可传代。采用内皮细胞特异性抗体 CD31 进行常规免疫组化染色,鉴定肺微血管内皮细胞,阳性结果为胞浆棕黄色(图 2)。

1.2.3 细胞分组和低氧 实验用第 3~5 代的肺动脉平滑肌细胞和肺微血管内皮细胞。按 10⁶/mL 浓度,接种入 6 孔培养板,每孔放入 24 mm×24 mm

的盖玻片 1 张,待细胞长至 80%融合时,换无血清的 DMEM 培养液使细胞生长同步 24 h。然后分为以下 4 组:常氧组,低氧 12 h、24 h、48 h 组,每组 3 个复孔。常氧组在普通 CO₂ 培养箱中培养;低氧组在低氧培养箱培养,通过充入 N₂ 和 CO₂,使氧浓度维持在 3%,CO₂ 浓度为 5%。

1.2.4 细胞免疫组化染色 在设定的时间终止低氧,收集各组细胞上清液后,用 40 g/L 多聚甲醛固定细胞爬片 30 min。免疫组化采用链亲和素过氧化物酶法(SP 法)。10%羊血清封闭 30 min 以阻断非特异性结合,然后滴加 20 μ g/mL 羊抗鼠多克隆 FKN 抗体,4 °C 过夜孵育。洗掉未结合的抗体,再滴加生物素化抗体,DAB 显色,阳性结果呈棕黄色,苏木素复染,显微镜下观察。用 Spot Cool CCD 显微-微机彩色图像处理系统采集图像,IMAGE-PRO plus 4.1 图像分析软件进行分析。随机测量每张细胞爬片的 20 个视野,测定细胞内免疫组化产物的平均吸光度值,计算其平均值,每组分析 3 张细胞爬片进行统计处理。以均数作为该组细胞表达 FKN 的水平。

1.2.5 细胞原位杂交染色 采用地高辛标记探针检测试剂盒检测,根据大鼠 FKN mRNA 序列设计寡核苷酸探针,其序列为 5'-AGGTCCTCTGTCT TGGAAAATATCAGTATG-3'。胃蛋白酶消化细胞爬片 30 min,2 h 预杂交后,滴加地高辛标记探针,38 °C 过夜孵育,滴加生物素化鼠抗地高辛,生物素化过氧化物酶。原位杂交结果分析同免疫组化。

1.2.6 细胞上清液中 FKN 浓度的检测 在设定的时间终止低氧,收集各组细胞上清液,离心(4000 r/min,10 min),留下上清液,-70 °C 保存,待检测。用 FKN ELISA 试剂盒测定细胞上清液中 FKN 浓度,实验具体操作按说明书进行。

1.3 统计学方法

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间总差异比较采用单因素方差分析,两两比较采用 q 检验, $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 低氧对大鼠肺动脉平滑肌细胞表达 FKN mRNA 和蛋白的影响

由图 3 和图 4 可见,FKN mRNA 主要表达在细胞膜上,而 FKN 蛋白在细胞膜和胞浆中均见表达。常氧时,部分肺动脉平滑肌细胞中可见 FKN mRNA 和蛋白表达,低氧后,FKN mRNA 和蛋白的表达细胞逐渐增多。统计分析显示:与对照

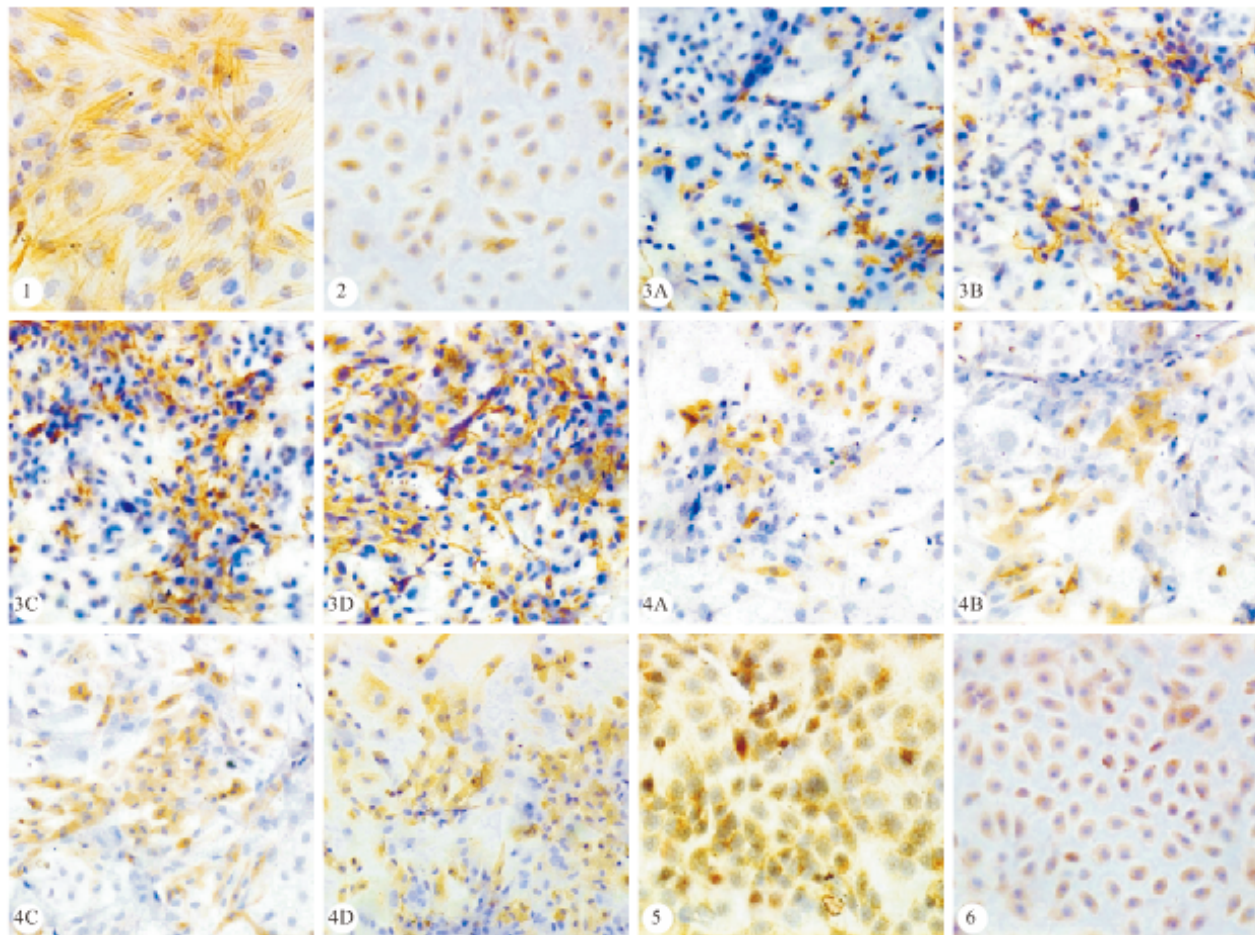


图 1 免疫组化鉴定大鼠肺动脉平滑肌细胞胞浆内见棕黄色肌丝。SP ×200
 图 2 免疫组化鉴定大鼠肺微血管内皮细胞胞浆呈棕黄色。SP ×200
 图 3 大鼠肺动脉平滑肌细胞 FKN mRNA 的表达。ISH ×200
 图 4 大鼠肺动脉平滑肌细胞 FKN 蛋白的表达。SP ×200
 图 5 大鼠肺微血管内皮细胞 FKN mRNA 的表达。ISH ×200
 图 6 大鼠肺微血管内皮细胞 FKN 蛋白的表达。SP ×200

Fig 1 Immunohistochemistry identification of PASMCS. SP ×200
 Fig 2 Immunohistochemistry identification of PMVECs. SP ×200
 Fig 3 Expression of FKN mRNA in PASMCS. ISH ×200
 Fig 4 Expression of FKN protein in PASMCS. SP ×200
 Fig 5 Expression of FKN mRNA in PMVECs. ISH ×200
 Fig 6 Expression of FKN protein in PMVECs. SP ×200

A: Normal rats; B: Hypoxia 12 h rats; C: Hypoxia 24 h rats; D: Hypoxia 48 h rats

组相比，肺动脉平滑肌细胞在低氧培养 12 h 后，其 FKN mRNA 和蛋白表达均无明显变化 ($P > 0.05$)，低氧 24 h 后则增加 ($P < 0.05$)，48 h 后增加更加明显 ($P < 0.01$)。低氧培养 48 h 后，肺动脉平滑肌细胞中 FKN mRNA 和蛋白表达均高于低氧 24 h (P

< 0.05)。提示低氧后，大鼠肺动脉平滑肌细胞表达 FKN mRNA 和蛋白呈时间依赖性增加，见表 1。

2.2 低氧对大鼠肺动脉平滑肌细胞分泌 FKN 的影响

与对照组相比，大鼠肺动脉平滑肌细胞在低氧

表 1 低氧对肺动脉平滑肌细胞表达 FKN mRNA、FKN 蛋白及其分泌 FKN 的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of hypoxia on the expression and production of FKN in PASMCS ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	FKN mRNA	FKN protein	FKN concentrations of supernatant fluid (pg/mL)
Control	0.1165 ± 0.0182	0.0904 ± 0.0100	161.8648 ± 37.4935
Hypoxia 12 h	0.1212 ± 0.0165	0.0962 ± 0.0174	252.4247 ± 52.3706
Hypoxia 24 h	0.1714 ± 0.0154 [△] *	0.1521 ± 0.0131 ^{△△} **	391.6728 ± 99.0075 ^{△△} *
Hypoxia 48 h	0.2391 ± 0.0163 ^{△△} * ** #	0.1989 ± 0.0154 ^{△△} * ** #	521.1887 ± 103.1015 ^{△△} **

[△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$, vs. Control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. Hypoxia 12 h group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, vs. Hypoxia 24 h group

培养 12 h 后,细胞上清液中 FKN 浓度无明显变化 ($P>0.05$);低氧 24 h 后细胞上清液中 FKN 浓度则增加 ($P<0.01$),为对照组的 2.42 倍;低氧 48 h 后细胞上清液中 FKN 浓度增加更加明显 ($P<0.01$),为对照组的 3.22 倍,见表 1。

2.3 低氧对大鼠肺微血管内皮细胞表达和分泌 FKN 的影响

表 2 低氧对肺微血管内皮细胞表达 FKN mRNA、FKN 蛋白及其分泌 FKN 的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of hypoxia on the expression and production of FKN in PMVECs ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Group	FKN mRNA	FKN protein	FKN concentrations of supernatant fluid (pg/mL)
Control	0.2528±0.0127	0.1472±0.0064	109.6998±39.1693
Hypoxia 12 h	0.2578±0.0185	0.1421±0.0129	119.4607±41.6872
Hypoxia 24 h	0.2570±0.0156	0.1551±0.0084	106.9780±30.2378
Hypoxia 48 h	0.2807±0.0123	0.1636±0.0105	124.4925±35.9405

3 讨论

FKN 是一种独一无二的趋化因子,具有可溶型和膜结合型两种表达形式。膜结合型 FKN 主要表达在内皮和上皮细胞表面,能够被肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1(IL-1)和干扰素- γ (IFN- γ)等炎症介质激活^[1,5],黏附表达其受体 CX3CR1 的细胞。可溶型 FKN 具有趋化因子的作用,能有效地促进单核细胞及淋巴细胞迁移,参与白细胞特别是单核细胞和淋巴细胞的游走和活化。两种形式的 FKN 通过它们共同的受体 CX3CR1 介导其生物活性作用,CX3CR1 则主要表达在 T 淋巴细胞、肥大细胞和 NK 细胞等细胞中^[6,7]。

研究发现,FKN 可以在离体培养的人主动脉和冠状动脉平滑肌细胞中表达^[8,9]。本实验显示,FKN 也可以在离体培养的大鼠肺动脉平滑肌细胞中表达,FKN mRNA 主要表达在细胞胞膜上,FKN 蛋白在细胞胞膜和胞浆中均见表达。常氧培养时,部分大鼠肺动脉平滑肌细胞表达 FKN mRNA 和蛋白,低氧后,表达 FKN mRNA 和蛋白的肺动脉平滑肌细胞逐渐增多。统计分析显示:低氧 24 h 后,肺动脉平滑肌细胞中 FKN mRNA 和蛋白水平开始增加,随着低氧时间延长,FKN mRNA 和蛋白水平增加更加明显。提示低氧可导致大鼠肺动脉平滑肌细胞表达 FKN 呈时间依赖性增加,此增加是通过基因水平调控的,而且主要是通过刺激表达 FKN 的肺动脉平滑肌细胞增加,而不仅仅是导致个别肺动脉平滑肌细胞表达 FKN 增多所致。此外,我们的研究显示,低氧后,大鼠肺动脉平滑肌细胞上清液中 FKN 浓度亦呈时间依赖性增加,提

示低氧也能刺激肺动脉平滑肌细胞分泌 FKN 增多。

示低氧也能刺激肺动脉平滑肌细胞分泌 FKN 增多。

示低氧也能刺激肺动脉平滑肌细胞分泌 FKN 增多。

示低氧也能刺激肺动脉平滑肌细胞分泌 FKN 增多。

示低氧也能刺激肺动脉平滑肌细胞分泌 FKN 增多。

示低氧也能刺激肺动脉平滑肌细胞分泌 FKN 增多。

示低氧也能刺激肺动脉平滑肌细胞分泌 FKN 增多。

示低氧也能刺激肺动脉平滑肌细胞分泌 FKN 增多。

示低氧也能刺激肺动脉平滑肌细胞分泌 FKN 增多。

参 考 文 献

- Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, *et al.* Fractalkine in vascular biology: from basic research to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2004;24(1):34-40.
- Zanchi C, Zoja C, Morigi M, *et al.* Fractalkine and CX3CR1 mediate leukocyte capture by endothelium in response to Shiga toxin. *J Immunol*,2008;181(2):1460-1469.
- Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, *et al.* A new class of

- membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature*,1997; 385(6617):640-644.
- 4 陈小菊, 程德云, 关 键等. 缺氧大鼠血清和肺内 fractalkine 的变化. *中华结核和呼吸杂志*,2006;29(1):54-55.
 - 5 Jones BA, Beamer M, Ahmed S. Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases. *Mol Interv*, 2010;10(5):263-270.
 - 6 Foussat A, Coulomb-Lhermine A, Gosling J, *et al*. Fractalkine receptor expression by T-lymphocyte subpopulations and *in vivo* production of fractalkine in human. *Eur J Immunol*,2000;30(1):87-97.
 - 7 Zhang JL, Patel JM. Role of the CX3CL1-CX3CR1 axis in chronic inflammatory lung diseases. *Int J Clin Exp Med*,2010; 3(3):233-244.
 - 8 Chandrasekar B, Mummidi S, Perla RP, *et al*. Fractalkine (CX3CL1) stimulated by nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent inflammatory signal induces aortic smooth muscle cell proliferation through an autocrine pathway. *Biochem J*, 2003;373(Pt 2):547-558.
 - 9 Barlic J, Zhang Y, Murphy PM. Atherogenic lipids induce adhesion of human coronary artery smooth muscle cells to macrophages by up-regulating chemokine CX3CL1 on smooth muscle cells in a TNF α -NF κ B-dependent manner. *J Biol Chem*, 2007;282(26):19167-19176.
 - 10 Garcia GE, Xia Y, Chen S, *et al*. NF-kappaB-dependent FKN induction in rat aortic endothelial cells stimulated by IL-1 beta, TNF-alpha, and LPS. *J Leukoc Biol*,2000;67(4):577-584.
 - 11 Fraticelli P, Sironi M, Bianchi G, *et al*. Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses. *J Clin Invest*,2001;107(9):1173-1181.
- (2012-03-28 收稿, 2012-05-24 修回)
编辑 沈 进

(上接第 660 页)

参 考 文 献

- 1 Thomas DA, Stefa Faderl S, Corte J, *et al*. Treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia with hyper-CVAD and imatinib mesylate. *Blood*, 2004; 103(12):4396-4407.
 - 2 Thomas DA. Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia; a new era of challenges. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*,2007;435-443.
 - 3 Nimmanapalli R, Bhalla K. Mechanisms of resistance to imatinib mesylate in Bcr-Abl-positive leukemias. *Curr Opin Oncol*,2002;14(6):616-620.
 - 4 Mauro MJ. Defining and managing imatinib resistance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*,2006;219-225.
 - 5 Radujkovic A, Schad M, Topaly J, *et al*. Synergistic activity of imatinib and 17-AAG in imatinib-resistant CML cells overexpressing BCR-ABL—inhibition of P-glycoprotein by 17-AAG. *Leukemia*,2005;19(7):1198-1206.
 - 6 Hirayama C, Watanabe H, Nakashima R, *et al*. Constitutive overexpression of P-glycoprotein, rather than breast cancer resistance protein or organic cation transporter 1, contributes to acquisition of imatinib-resistance in K562 cells. *Pharm Res*, 2008;25(4):827-835.
 - 7 Sharom FJ. ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*, 2008; 9(1): 105-127.
 - 8 Oostendorp RL, Buckle T, Beijnen JH, *et al*. The effect of P-gp (Mdr1a/1b), BCRP (Bcrp1) and P-gp/BCRP inhibitors on the *in vivo* absorption, distribution, metabolism and excretion of imatinib. *Invest New Drugs*,2009;27(1):31-40.
 - 9 杨 曦, 龚玉萍, 杨 雷等. 雷帕霉素单药及联合硼替佐米、柔红霉素对白血病细胞株抗肿瘤效应的研究. *中华血液学杂志*, 2010;31(3):201-203.
 - 10 Hamada A, Wantanabe H, Nakashima H, *et al*. Interaction of imatinib mesilate with human P-glycoprotein. *J Pharmacol Exp Ther*,2003;307(2):824-828.
- (2012-02-15 收稿, 2012-05-29 修回)
编辑 余 琳