

氯化锂通过激活 Wnt 信号通路促进内皮祖细胞的增殖能力

崔 斌, 刘 曦, 李佳蓓, 秦浙学, 于世勇, 黄 岚

(第三军医大学新桥医院全军心血管内科研究所, 重庆市 400037)

[关键词] 糖原合酶激酶 3 β ; 内皮祖细胞; 氯化锂; 细胞增殖; Wnt 信号通路

[摘要] 目的 探讨糖原合酶激酶 3 β (GSK-3 β)抑制剂氯化锂对内皮祖细胞增殖的作用机制。方法 密度梯度离心法分离大鼠骨髓源性内皮祖细胞,体外培养 7 天后分别给予不同浓度氯化锂(5、10、20、40 mmol/L)以抑制内皮祖细胞的 GSK-3 β 活性。分别采用镜下计数法及四氮唑溴盐比色法测定内皮祖细胞增殖能力,荧光激活细胞分离仪分析各组内皮祖细胞的细胞周期变化。采用蛋白印迹法测定 Wnt 信号通路中磷酸化 GSK-3 β 、 β -连环蛋白及细胞周期蛋白 D1 的蛋白表达。结果 氯化锂在一定浓度范围内可剂量依赖性地增加内皮祖细胞数量。与对照组比较,不同浓度氯化锂组(5、10、20 mmol/L)内皮祖细胞数量显著增加($P<0.05, n=5$)。四氮唑溴盐比色法检测氯化锂各浓度组内皮祖细胞在 490 nm 处吸光度值与对照组比较差异有显著性($P<0.05, n=5$)。荧光激活细胞分离仪分析显示氯化锂组细胞周期 S 期较对照组显著增加($P<0.05, n=3$)。蛋白印迹法测定表明,与对照组比较氯化锂可显著增加磷酸化 GSK-3 β 、 β -连环蛋白及细胞周期蛋白 D1 的蛋白表达($P<0.05, n=3$)。结论 GSK-3 β 抑制剂氯化锂可通过激活 Wnt 信号通路显著促进内皮祖细胞的增殖能力。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Glycogen synthase kinase 3 β inhibitor lithium chloride increased the proliferation of endothelial progenitor cell by activating Wnt signaling pathway

CUI Bin, LIU Xi, LI Jia-Bei, QIN Zhe-Xue, YU Shi-Yong, HUANG Lan

(Institute of Cardiovascular Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University of PLA, Chongqing 400037, China)

[KEY WORDS] Glycogen synthase kinase 3 β ; Endothelial progenitor cell; Lithium chloride; Cell proliferation; Wnt signal pathway

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the mechanism of glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) inhibitor lithium chloride on the proliferation of endothelial progenitor cells (EPC). **Methods** Mononuclear cells were isolated from bone marrow in rats by density gradient centrifugation combined. After 7 days, EPC were cultured with different concentrations of GSK-3 β inhibitor lithium chloride. EPC proliferation were assessed by cells count and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. The cell cycle of EPC was measured by fluorescence-activated cell sorting (FACS). The expression of phospho-GSK-3 β (pGSK-3 β), β -catenin and cyclinD1 in EPC were detected by Western blot. **Results** Lithium chloride improved EPC proliferation. The number of EPC was obviously increased in lithium chloride group than that in control group. Compared with control group, EPC proliferation was enhanced in a dose-dependent manner in lithium chloride groups. S phrase in cell cycle was increased in lithium chloride group in comparison with control group by FACS assay. The protein expression of pGSK-3 β , β -catenin and cyclinD1 were significantly higher than that in control group. **Conclusion** GSK-3 β inhibitor lithium chloride could enhance EPC proliferation by activating Wnt signal pathway.

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性疾病共同的病理生

理基础。加速损伤血管的再内皮化进程成为损伤性血管疾病防治领域的一个关键问题。研究发现兼具

[收稿日期] 2017-03-09

[修回日期] 2017-06-16

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81100149)

[作者简介] 崔斌, 博士, 副主任医师, 研究方向为血管内皮损伤的防治, E-mail 为 cuibin_xqhospital@126.com。通讯作者黄岚, 博士, 主任医师, 研究方向为冠心病诊断和治疗, E-mail 为 huanglan260@126.com。

干细胞及内皮细胞特性的内皮祖细胞 (endothelial progenitor cell, EPC) 在内膜修复中的作用不可或缺^[1-3]。然而成体循环中 EPC 数量有限, 冠心病多种危险因素严重影响 EPC 的数量及功能, 限制了 EPC 自体移植在血管损伤性疾病中的临床应用^[4-8]。因此, 积极阐明 EPC 增殖分化的调控机制具有重要意义。近来研究发现糖原合酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 不仅参与细胞内糖代谢过程, 还参与干细胞的增殖、分化和凋亡等多种重要生理过程^[9-12]。EPC 具备干细胞部分特性, 我们推测 GSK-3 β 可能在其增殖功能上发挥调节作用。本研究中我们重点研究 GSK-3 β 抑制剂氯化锂 (lithium chloride, LiCl) 在 EPC 增殖中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

大鼠淋巴细胞分离液购于天津灏洋生物公司; 优质胎牛血清、DMEM 培养液购自 Hyclone 公司; 乙酰化低密度脂蛋白 (acetylated low density lipoprotein labeled with 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate, DiI-ac-LDL) 购自 Molecular Probe 公司; 人纤维连接蛋白、二苯基四氮唑溴盐 (MTT)、胰蛋白酶、硫氰酸荧光素标记荆豆凝集素 I (FITC-UEA-I)、二甲基亚砜 (DMSO)、磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 及氯化锂购自 Sigma 公司; 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 购自 Pepro Tech 公司; 单克隆兔抗大鼠磷酸化 GSK-3 β (phosphor-glycogen synthase kinase 3 β , pGSK-3 β)、 β -连环蛋白 (β -catenin) 及细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1) 抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.2 内皮祖细胞的分离培养与鉴定

采用 Ficoll 密度梯度离心法分离大鼠骨髓源性单个核细胞, 接种于包被纤连蛋白的培养瓶中, 在添加了 20% 胎牛血清、50 μ g/L VEGF 的 DMEM 培养液中培养, 3~4 天更换培养液, 细胞培养至 7 天供实验使用。采用 ac-LDL 摄取法及 FITC-UEA-I 细胞免疫荧光法对 EPC 进行鉴定, 荧光显微镜下 DiI-ac-LDL 和 FITC-UEA-I 染色双阳性细胞为正在分化的 EPC^[13]。

1.3 实验分组

分为药物干预组和对照组。药物干预组分别给予不同浓度氯化锂 (5、10、20、40 mmol/L LiCl 组) 以抑制 EPC 的 GSK-3 β 活性, 对照组给予等量

DMEM 细胞培养液, 37 $^{\circ}$ C 培养 48 h 进行后续分析。

1.4 细胞增殖能力检测

1.4.1 镜下计数法 荧光倒置显微镜下对每组 DiI-ac-LDL 和 FITC-UEA-I 染色双阳性的 EPC 进行计数 (计数 5 个随机选择的 200 倍视野的 EPC)。

1.4.2 MTT 检测法 0.25% 胰蛋白酶消化收集不同浓度氯化锂作用下的 EPC, 500 μ L 培养液重悬细胞计数。将等量 EPC 接种到 96 孔培养板中培养 48 h, 每组 5 个平行孔, 加入 MTT 6 h 后弃上清, 加入 DMSO 终止反应, 放置于微量振荡器上充分震荡 10 min, 酶联免疫检测仪 490 nm 波长处检测吸光度值。

1.5 细胞周期检测

分别离心收集各组 EPC, PBS 洗涤 2 次, 70% 预冷乙醇固定, 4 $^{\circ}$ C 过夜。PBS 洗涤后 EPC 重悬于 50 mL/L 的溴化乙锭染液中, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min。流式细胞仪分析 DNA 含量分布, 计算 G₀/G₁ 期、S 期及 G₂/M 期细胞比例。每组实验重复 3 次。

1.6 蛋白印迹法检测蛋白表达

分别提取各组 EPC 蛋白, 测定蛋白总浓度。电泳分离、电转膜、封闭后分别加入单克隆兔抗大鼠 pGSK-3 β (1 : 1000)、 β -catenin (1 : 1000) 及 CyclinD1 (1 : 500) 抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (1 : 1000) 孵育 2 h。化学发光法显影, 凝胶成像分析仪测定蛋白表达。

1.7 统计学处理方法

采用 SPSS18.0 统计软件包进行统计学处理, 实验测得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 内皮祖细胞培养及鉴定结果

密度梯度法分离获取的单个核细胞 48 h 后开始贴壁, 逐渐生长呈梭形或纺锤形内皮样细胞。荧光显微镜下可见 FITC-UEA-I 和 DiI-ac-LDL 染色双阳性细胞 (图 1)。

2.2 氯化锂增加内皮祖细胞数量及增殖能力

使用氯化锂预处理 EPC 以抑制 EPC 中 GSK-3 β 活性, 观察氯化锂对 EPC 增殖功能的影响。发现氯化锂预处理的 EPC 数量在一定浓度范围呈剂量依赖性增加。与对照组比较, 5、10、20 mmol/L 氯化锂可显著增加 EPC 数量 ($P < 0.05$) 及增殖能力 ($P < 0.01$; 表 1)。然而, 我们发现 40 mmol/L 的氯化锂可造成 EPC 数量显著减少、大量死亡, 故将此组在后续实验中剔除。

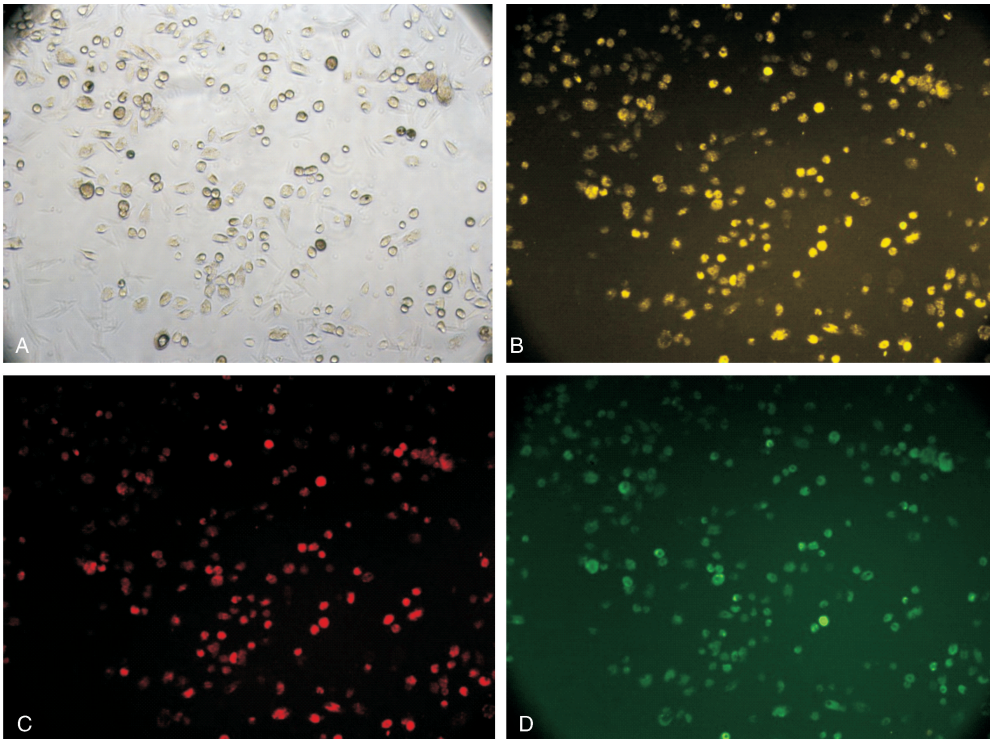


图 1. 内皮祖细胞形态及鉴定(200×) A 为 EPC 培养 48 h 后开始贴壁,逐渐生长呈梭形或纺锤形内皮样细胞;B 为 DiI-ac-LDL 和 FITC-UEA-I 染色双阳性细胞即 EPC;C 为 EPC 摄取 DiI-ac-LDL 表达红色荧光;D 为 EPC 与 FITC-UEA-I 结合表达绿色荧光。

Figure 1. Morphology and identification of endothelial progenitor cells(200×)

表 1. 氯化锂增加内皮祖细胞数量及增殖能力(n=5)
Table 1. lithium chloride increased endothelial progenitor cell proliferation(n=5)

分 组	EPC 细胞数(个)	吸光度值
对照组	37.0±2.0	0.265±0.0232
5 mmol/L 氯化锂组	42.4±2.7 ^a	0.3658±0.0304 ^b
10 mmol/L 氯化锂组	54.2±3.8 ^b	0.4436±0.0347 ^b
20 mmol/L 氯化锂组	58.6±3.0 ^b	0.6528±0.0338 ^b

a 为 P<0.05,b 为 P<0.01,与对照组比较。

2.3 氯化锂对内皮祖细胞细胞周期的影响

荧光激活细胞分离仪分析发现,5、10、20 mmol/L氯化锂增加 EPC 的 S 期比例,与对照组比较差异有显著性(P<0.05;表 2)。

表 2. 氯化锂对内皮祖细胞细胞周期的影响(n=3)
Table 2. Lithium chloride influenced the cell cycle of endothelial progenitor cell(n=3)

分 组	G ₀ /G ₁ 期(%)	S 期(%)	G ₂ /M 期(%)
对照组	82.88±2.82	14.62±0.62	2.50±0.26
5 mmol/L 氯化锂组	79.28±3.09	17.21±0.85 ^a	3.51±0.32 ^b
10 mmol/L 氯化锂组	71.23±3.22 ^b	24.38±1.14 ^b	4.39±0.48 ^b
20 mmol/L 氯化锂组	62.66±4.14 ^b	33.15±2.42 ^b	4.19±0.36 ^b

a 为 P<0.05,b 为 P<0.01,与对照组比较。

2.4 氯化锂对内皮祖细胞中 Wnt 信号通路的影响

为了明确 GSK-3β 抑制剂氯化锂对 EPC 中 GSK-3β 下游信号通路的调节作用,我们采用 Western blot 测定 pGSK-3β、β-catenin 及 CyclinD1 的蛋白表达。结果表明,与对照组比较氯化锂可显著增加 pGSK-3β、β-catenin 及 CyclinD1 的蛋白表达(P<0.01;图 2)。

3 讨 论

EPC 是血管内皮细胞的前体细胞,可分化为内皮细胞参与损伤内皮的修复过程。自 EPC 被发现以来,各国学者积极研究其在血管再内皮化中的作用,试图将其作为种子细胞应用于血管损伤性疾病的临床治疗。然而,成体外周循环中 EPC 数量有限,且心血管危险因素严重影响 EPC 生物学功能,限制了 EPC 自体移植的临床应用。因此,积极探寻有效扩增 EPC 数量、改善细胞功能的机制将为 EPC 临床应用提供可能。

近年来国外学者相继报道 GSK-3β 参与胚胎干细胞、造血干细胞及神经干细胞的增殖、分化及凋亡过程,我们推测 GSK-3β 对兼具干细胞特性的 EPC 可能发挥相似的调控作用。氯化锂作为 GSK-

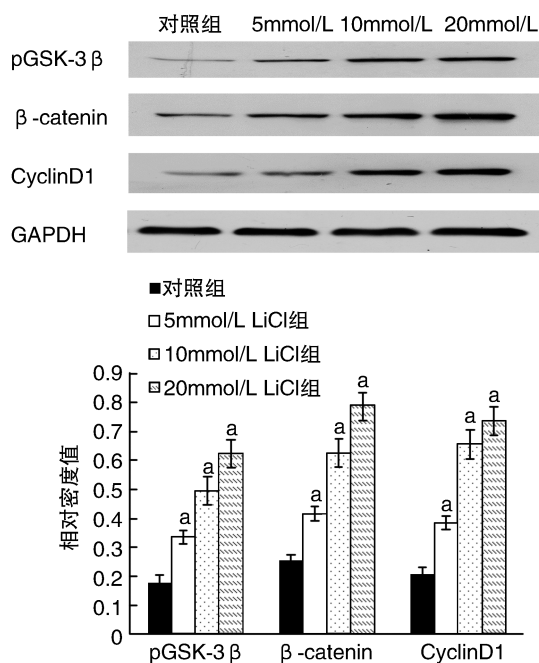


图2. 氯化锂增加 pGSK-3 β 、 β -catenin 及 CyclinD1 的蛋白表达 a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

Figure 2. Lithium chloride increased the expression of pGSK-3 β , β -catenin and CyclinD1

3 β 抑制剂被广泛应用,其通过磷酸化丝氨酸 N 末端结构域而抑制 GSK-3 β 活性。我们以不同浓度的氯化锂预处理 EPC,结果发现在 5~20 mmol/L 浓度范围内氯化锂可剂量依赖性的促进 EPC 的增殖能力,而 40 mmol/L 浓度的氯化锂则对细胞产生毒性作用,造成细胞的大量死亡。我们的结果与此前 Hibbert 及 Choi 等研究小组的结论一致。Hibbert、Choi 等^[14-18] 研究发现通过基因转染或药物干预以抑制 GSK-3 β 活性,可以显著增加 EPC 数量、抑制血管内膜增生、促进损伤动脉的再内皮化,并可加速药物涂层支架延迟的再内皮化进程。我们分析抑制 GSK-3 β 活性加速血管再内皮化可能基于其对 EPC 增殖能力的显著促进作用,然而其可能促增殖机制较少报道。我们进一步对 GSK-3 β 抑制剂氯化锂促进 EPC 增殖的可能机制进行初探。流式细胞仪对细胞周期进行分析发现氯化锂可减低 EPC 中 G₀/G₁ 期比例,显著增加 S 期比例,表明抑制 GSK-3 β 活性可促进 EPC 向 DNA 合成期及有丝分裂期的转化。研究还发现氯化锂可对 Wnt 下游信号通路产生影响,通过 Western blot 检测发现抑制 GSK-3 β 活性可显著增加 pGSK-3 β 、 β -catenin 及 CyclinD1 的蛋白表达。 β -catenin 是 Wnt 通路中传递信号的重要分子,在调控细胞增殖中发挥核心作用。Wnt

信号通路激活后可抑制细胞内 GSK-3 β 的活性,从而减弱后者对 β -catenin 的磷酸化。未磷酸化的 β -catenin 在胞质中大量积累,并转运至胞核,与转录因子 TCF/LEF 结合形成异源二聚体,激活 TCF/LEF 活性,启动下游靶基因 CyclinD1、c-myc 等的转录和表达。CyclinD1 主要分布于细胞核中,是重要的细胞周期调控蛋白,参与细胞的增殖。本研究结果显示氯化锂可有效作用于 Wnt/ β -catenin 信号通路,通过上调 β -catenin、CyclinD1 的表达水平,促进 EPC 细胞进入 S 期,从而增加 EPC 增殖能力。

综上所述,氯化锂作为 GSK-3 β 抑制剂可激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,调控细胞周期促进 EPC 增殖,这将为体外有效扩增自体 EPC 治疗血管损伤性疾病的临床应用提供实验依据。

[参考文献]

- [1] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis [J]. Science, 1997, 275(5302): 964-967.
- [2] Liu NM, Siu KL, Youn JY, et al. Attenuation of neointimal formation with netrin-1 and netrin-1 preconditioned endothelial progenitor cells [J]. J Mol Med (Berl), 2017, 95(3): 335-348.
- [3] Srikanth GV, Kishore R. Endothelial progenitor cells: procedure for cell isolation and applications [J]. Methods Mol Biol, 2017, 1553: 85-89.
- [4] Bakogiannis C, Tousoulis D, Androulakis E, et al. Circulating endothelial progenitor cells as biomarkers for prediction of cardiovascular outcomes [J]. Curr Med Chem, 2012, 19(16): 2597-604.
- [5] King TF, McDermott JH. Endothelial progenitor cells and cardiovascular disease [J]. Stem cells, 2014, 9(2): 93-106.
- [6] Altabas V, Altabas K, Kirigin L. Endothelial progenitor cells (EPCs) in ageing and age-related diseases: How currently available treatment modalities affect EPC biology, atherosclerosis, and cardiovascular outcomes [J]. Mech Ageing Dev, 2016, 159(10): 49-62.
- [7] 张楠,刘寅,高明东. 慢性稳定型心绞痛患者 PCI 术后循环内皮祖细胞计数变化及其影响因素[J]. 中国动脉硬化杂志, 2017, 25(2): 165-170.
- [8] 蒋艳平,王波,曾高峰,等. 高血压前期人群一氧化氮水平的性别差异及其与内皮祖细胞的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(9): 934-938.
- [9] Wils J, Favre J, Bellien J. Modulating putative endothelial progenitor cells for the treatment of endothelial dysfunction and cardiovascular complications in diabetes [J]. Pharmacol Ther, 2017, 170: 98-115.

(下转第 1001 页)

- [7] Ertl G, Brenner S, Angermann CE. Cardiac remodeling after myocardial infarction: clinical practice update [J]. *Herz*, 2017, 42: 107-120.
- [8] Roubille F, Lacampagne A. New drug avenues for cardioprotection in patients with acute myocardial infarction [J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2014, 14: 73-77.
- [9] Song M, Jang H, Lee J, et al. Regeneration of chronic myocardial infarction by injectable hydrogels containing stem cell homing factor SDF-1 and angiogenic peptide Ac-SDKP [J]. *Biomaterials*, 2014, 35: 2 436-445.
- [10] Bauters C, Pinet F. MicroRNAs as circulating biomarkers of left ventricular remodeling after myocardial infarction [J]. *Cardiology*, 2016, 133: 262-263.
- [11] Martinez-Fernandez A. MicroRNA therapy for the failing heart [J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2014, 7: 393-394.
- [12] Wang X, Zhang X, Ren XP, et al. MicroRNA-494 targeting both pro-apoptotic and anti-apoptotic proteins protects against ischemia/reperfusion-induced cardiac injury [J]. *Circulation*, 2010, 122: 1 308-318.
- [13] Xiong J. Emerging roles of microRNA-22 in human disease and normal physiology [J]. *Curr Mol Med*, 2012, 12: 247-258.
- [14] Song SJ, Ito K, Ala U, et al. The oncogenic microRNA miR-22 targets the TET2 tumor suppressor to promote hematopoietic stem cell self-renewal and transformation [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13: 87-101.
- [15] Gurha P, Abreu-Goodger C, Wang T, et al. Targeted deletion of microRNA-22 promotes stress-induced cardiac dilation and contractile dysfunction [J]. *Circulation*, 2012, 125: 2 751-761.
- [16] Ono K, Kuwabara Y, Han J. MicroRNAs and cardiovascular diseases [J]. *FEBS J*, 2011, 278: 1 619-633.
- [17] Chen J, Wang DZ. microRNAs in cardiovascular development [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 12: 949-957.
- [18] Jovicic A, Zaldivar Jolissaint JF, Moser R, et al. MicroRNA-22 (miR-22) overexpression is neuroprotective via general anti-apoptotic effects and may also target specific Huntington's disease-related mechanisms [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e54222.
- [19] Yu H, Wu M, Zhao P, et al. Neuro-protective effects of viral over-expression of microRNA-22 in rat and cell models of cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116: 233-241.

(此文编辑 许雪梅)

(上接第 988 页)

- [10] Umehara H, Kimura T, Ohtsuka S, et al. Efficient derivation of embryonic stem cells by inhibition of glycogen synthase kinase-3 [J]. *Stem Cells*, 2007, 25 (11): 2 705-711.
- [11] Esfandiari F, Fathi A, Gourabi H, et al. Glycogen synthase kinase-3 inhibition promotes proliferation and neuronal differentiation of human-induced pluripotent stem cell-derived neural progenitors [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21(17): 3 233-243.
- [12] Huang J, Guo X, Li W, et al. Activation of Wnt/ β -catenin signalling via GSK3 inhibitors direct differentiation of human adipose stem cells into functional hepatocytes [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 40 716.
- [13] Cui B, Huang L, Fang YQ, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells overexpressing endothelial nitric oxide synthase enhances inhibition of neointimal hyperplasia and restores endothelium-dependent vasodilatation [J]. *Microvasc Res*, 2011, 81(1): 143-150.
- [14] Choi JH, Hur J, Yoon CH, et al. Augmentation of therapeutic angiogenesis using genetically modified human endothelial progenitor cells with altered glycogen synthase kinase-3 β activity [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(47): 49 430-438.
- [15] Hibbert B, Lavoie JR, Ma X, et al. Glycogen synthase kinase-3 β inhibition augments diabetic endothelial progenitor cell abundance and functionality via cathepsin B: a novel therapeutic opportunity for arterial repair [J]. *Diabetes*, 2014, 63(4): 1 410-421.
- [16] Ma X, Hibbert B, Dhaliwal B, et al. Delayed re-endothelialization with rapamycin-coated stents is rescued by the addition of a glycogen synthase kinase-3 β inhibitor [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 86(2): 338-345.
- [17] Hibbert B, Ma X, Pourdjabbar A, et al. Inhibition of endothelial progenitor cell glycogen synthase kinase-3 β results in attenuated neointima formation and enhanced re-endothelialization after arterial injury [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 83(1): 16-23.
- [18] Dai X, Yan X, Zeng J, et al. Elevating CXCR7 improves angiogenic function of EPCs via Akt/GSK-3 β /Fyn-mediated Nrf2 activation in diabetic limb ischemia [J]. *Circ Res*, 2017, 120(5): e7-e23.

(此文编辑 许雪梅)