

内皮细胞低氧复氧损伤模型的建立

胡佳, 谢佳欣, 成姣, 韦星

(南华大学心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室 湖南省动脉硬化性疾病国际科技创新合作基地, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 人脐静脉内皮细胞; 低氧复氧损伤模型; 三气培养箱

[摘要] **目的** 构建人血管内皮细胞低氧复氧损伤模型, 作为心肌组织慢复流的体外研究模型。**方法** 设定三气培养箱的混合气中 5% O₂ 为低氧培养条件, 二氧化碳培养箱 (95% 空气、5% CO₂) 中的培养条件为复氧条件。将对数生长期的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 随机分为 5 组, 分别置于三气培养箱 (90% N₂、5% CO₂、5% O₂) 中处理不同时间 (0、4、8、16 及 32 h)。挑选出最佳低氧处理时间后, 再将随机分组的细胞进行不同时间 (0、1、2、3、4、5 及 6 h) 的复氧处理。Western blot 检测低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 的蛋白表达; 显微镜下观察细胞形态学变化; CCK-8 法检测细胞存活率; 酶联免疫吸附法测定乳酸脱氢酶 (LDH) 活性以反映细胞损伤情况。**结果** 与对照组相比, 实验组 HUVEC 的 HIF-1 α 蛋白表达随低氧处理时间的延长而增高 ($P < 0.01$); 细胞密度在低氧处理的短时间内会适应性增加, 从 16 h 开始降低; 细胞存活率的变化趋势与细胞密度一致 ($P < 0.01$); LDH 活性则在低氧 4 h 时升高, 低氧 8 h 时回落, 低氧 16 h 时又重新回升 ($P < 0.01$)。复氧后, 细胞密度与细胞存活率的变化随时间呈现先降低后升高的趋势 ($P < 0.05$); LDH 活性则随时间呈现先升高后降低的趋势, 峰值出现于复氧 3 h ($P < 0.01$)。实验结果表明, 低氧 16 h 为最佳低氧处理时间, 复氧 3 h 为最佳复氧处理时间。**结论** 本研究建立了稳定可靠的 HUVEC 低氧复氧损伤模型, 为心肌组织缺血再灌注后慢复流的体外实验研究奠定了基础。

[中图分类号] R331; R54

[文献标识码] A

Establishment of hypoxia/reoxygenation injury model of endothelial cells

HU Jia, XIE Jiaxin, CHENG Jiao, WEI Xing

(Institute of Cardiovascular Diseases & Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province & Hunan International Scientific and Technological Cooperation Base of Arteriosclerotic Disease, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] human umbilical vein endothelial cell; hypoxia/reoxygenation injury model; three-gas incubator

[ABSTRACT] **Aim** To establish a hypoxia/reoxygenation injury model of human vascular endothelial cells as an in vitro study model of myocardial slow-reflow. **Methods** 5% O₂ in the mixture of three-gas incubator was set as hypoxia culture condition, and the culture condition in carbon dioxide incubator (95% air and 5% CO₂) was set as reoxygenation condition. Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) in logarithmic growth stage was randomly divided into five groups, and treated in three-gas incubator (90% N₂, 5% CO₂ and 5% O₂) for different time (0, 4, 8, 16 and 32 h). After selecting the best hypoxia treatment time, the cells randomly divided into groups were reoxygenated for different time (0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 h). Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) protein expression was detected by Western blot; Cell morphological changes were observed under microscope; CCK-8 method was used to detect the cell survival rate; Lactate dehydrogenase (LDH) activity was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to reflect cell damage.

Results Compared with the control group, the expression of HIF-1 α protein of HUVEC in the experimental group increased with the prolongation of hypoxia treatment time ($P < 0.01$). Cell density increased adaptively in a short time after hypoxia treatment and decreased from 16 h; The change trend of cell survival rate was consistent with cell density ($P < 0.01$). LDH activity increased at 4 h of hypoxia, decreased at 8 h of hypoxia, and increased again at 16 h of hypoxia

[收稿日期] 2021-03-12

[修回日期] 2021-04-16

[基金项目] 湖南省教育厅科学研究重点项目 (19A432)

[作者简介] 胡佳, 硕士, 研究方向为心血管病病因、发病机制及防治, E-mail 为 879471434@qq.com。通信作者韦星, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管病病因、发病机制及防治, E-mail 为 weijiajun17528@163.com。

($P < 0.01$). After reoxygenation, the changes of cell density and cell survival rate showed a trend of first decreasing and then increasing with time ($P < 0.05$). LDH activity showed a trend of first increasing and then decreasing with time, and the peak value appeared at 3 h after reoxygenation ($P < 0.01$). The experimental results showed that 16 h of hypoxia was the best hypoxia treatment time, and 3 h of reoxygenation was the best reoxygenation treatment time. **Conclusion** In this study, a stable and reliable HUVEC hypoxia/reoxygenation injury model is established, which lay the foundation for the in vitro experimental study of slow-reflow after myocardial tissue ischemia/reperfusion.

临床上有约 10% ~ 50% 的急性心肌梗死患者在行血运重建治疗后会慢复流 (slow-reflow) 或无复流现象,即存在冠状动脉血流无法正常恢复的情况,增加了在院死亡率及再发心肌梗死的发生率^[1-2]。其发生机制与血管内皮细胞的结构和功能损伤有关,由于细胞钙超载、自由基生成增多、局部舒缩血管因子不平衡等的发生,加之内皮细胞释放的黏附分子增多、微血管壁通透性增加,可使心肌组织的血液灌流出现障碍^[3]。因此,如何在心肌血运重建时尽可能地维持内皮细胞功能,减轻其损伤,继而减少慢复流或无复流的发生,成为临床研究的一个热点。慢复流发生时,因心肌组织仍有血液供应,与完全断流的无复流现象有所不同,因而慢复流的发生机制是否与无复流有所区别尚待研究。因此,建立稳定的内皮细胞低氧复氧 (hypoxia/reoxygenation) 损伤模型,对于研究慢复流的发生机制具有重要意义。

细胞低氧复氧损伤模型不同于完全缺氧,是在细胞低氧供的基础上再恢复正常供氧,从而制造细胞损伤模型。国内外现有的文献报道细胞缺氧模型的建立方法分物理性方法与化学性方法。物理性方法主要包括液体石蜡封闭法、缺氧密闭盒混合气体法及混合气体培养法;化学性方法包括氯化钴法、连二亚硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 法和叠氮法等^[4-11]。为了模拟更接近体内的慢复流损伤,本研究采用三气培养箱制作细胞低氧模型,对不同的低氧处理时间和复氧时间下的细胞状态进行动态观察,借此构建稳定有效的内皮细胞低氧复氧损伤模型。

1 材料和方法

1.1 主要材料、试剂与仪器

原代人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 购自中国科学院细胞库;细胞培养基 (Gibco 公司);胎牛血清 (Gibco 公司);胰酶细胞消化液 (Gibco 公司);磷酸盐缓冲液 (PBS) (北京索莱宝科技有限公司);细胞计数检测试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) (江苏碧云天生物技术

公司);乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (南京建成公司);低氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 抗体 (Proteintech 公司);三气培养箱 (Esco 公司);倒置光学相差显微镜 (Olympus 公司)。

1.2 内皮细胞低氧复氧损伤模型的构建

(1) 细胞培养:将 HUVEC 接种于含 10% 胎牛血清的培养瓶中,放入二氧化碳培养箱中培养,每 1 ~ 2 天更换新鲜培养液,当细胞长至约 80% 融合度时进行消化传代或分组。

(2) 低氧处理时间的确定:细胞被随机分为 5 组,即对照组 (低氧 0 h, H0h 组) 与不同低氧处理时间的 4 个实验组: H4h 组、H8h 组、H16h 组和 H32h 组,实验组分别接受 4、8、16 及 32 h 的低氧处理。低氧处理时, HUVEC 换用无糖无血清培养基,并置入含 90% N_2 、5% CO_2 、5% O_2 混合气的三气培养箱中培养。对照组正常培养、换液,无低氧、复氧处理。处理结束后通过观察细胞形态及检测相应指标来确定最佳低氧处理时间。

(3) 复氧时间的确定:细胞被随机分为 7 组,即对照组 (复氧 0 h, R0h 组) 与不同复氧时间的 6 个实验组: R1h 组、R2h 组、R3h 组、R4h 组、R5h 组和 R6h 组,实验组分别接受 1、2、3、4、5 及 6 h 的复氧处理。以二氧化碳培养箱 (95% 空气、5% CO_2) 中的培养条件为复氧条件。实验组细胞在行最佳低氧处理时间处理完成之后换用正常完全培养基,并置入二氧化碳培养箱中实施常规培养。处理结束后通过观察细胞形态及检测相应指标来确定最佳复氧时间。

(4) 细胞形态学观察:各组细胞处理完成后,在倒置光学相差显微镜下观察细胞形态及贴壁细胞数量变化。

1.3 Western blot 检测 HIF-1 α 的表达

去掉培养瓶中培养液,用预冷的 PBS 洗两次并沥干,在细胞贴壁面加入裂解液和苯甲基磺酰氟 (体积比为 94 : 6),然后在冰上静置 40 min。待充分裂解后,刮下细胞,并吸入离心管中,将离心管置

于已经预冷的离心机中,4℃,12 000 r/min 离心 10 min。离心后留取上清液加入 1:4 比例的缓冲液充分混匀,煮沸 10 min 后置于冰上冷却,10 min 后放入-20℃冰箱保存。制胶后上样,经过电泳、转膜、封闭和抗体孵育后,配制显影液进行显影。

1.4 CCK-8 法检测细胞存活率

各组细胞处理完成后,在避光条件下加入 CCK-8 溶液 10 μ L/孔(96 孔板),于培养箱中孵育 1 h。用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度值。

1.5 LDH 活性检测

收集各组细胞上清液,按照 LDH ELISA 试剂盒要求进行操作,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度值。

1.6 统计学分析

所有指标均重复测量 3 次,取均值。采用 GraphPad Prism 6.0 软件对数据进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用单因素方差分析比较组间差异, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 最佳低氧时间的确定

2.1.1 不同低氧时间低氧有效性验证——HIF-1 α 蛋白的表达 相较于 H0h 组,H8h 组、H16h 组、H32h 组细胞的 HIF-1 α 蛋白表达显著增高。同时,H8h 组、H16h 组、H32h 组也存在组间差异,随着低氧时间的延长,HUVEC 中 HIF-1 α 蛋白的表达逐渐

增高(图 1)。

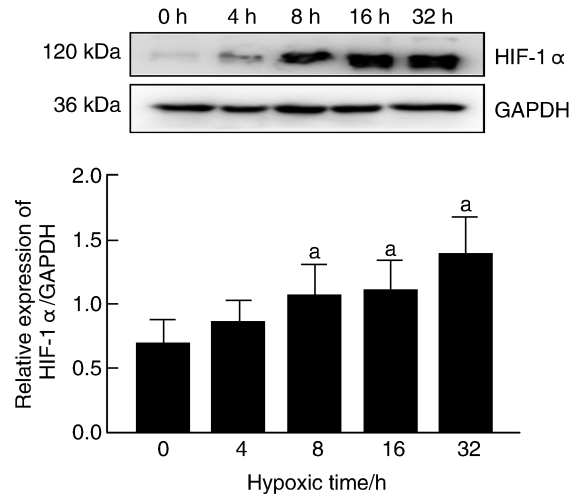


图 1. 不同低氧时间处理 HUVEC 后 HIF-1 α 蛋白表达的变化($n=3$)

a 为 $P < 0.01$,与 H0h 组比较。

Figure 1. Changes of HIF-1 α protein expression after HUVEC treated with different hypoxic time ($n=3$)

2.1.2 不同低氧时间细胞形态学改变 在倒置显微镜镜下通过形态学观察,H0h 组细胞贴壁生长,生长良好,细胞呈短梭形,密度高。而随着低氧时间的延长,细胞逐渐减少,漂浮细胞逐渐增多,细胞呈长梭形,贴壁细胞密度下降,细胞之间间隙增大,培养液愈见浑浊,折光度渐差。特别是 H16h 组、H32h 组,细胞密度以及细胞形态出现明显改变(图 2)。

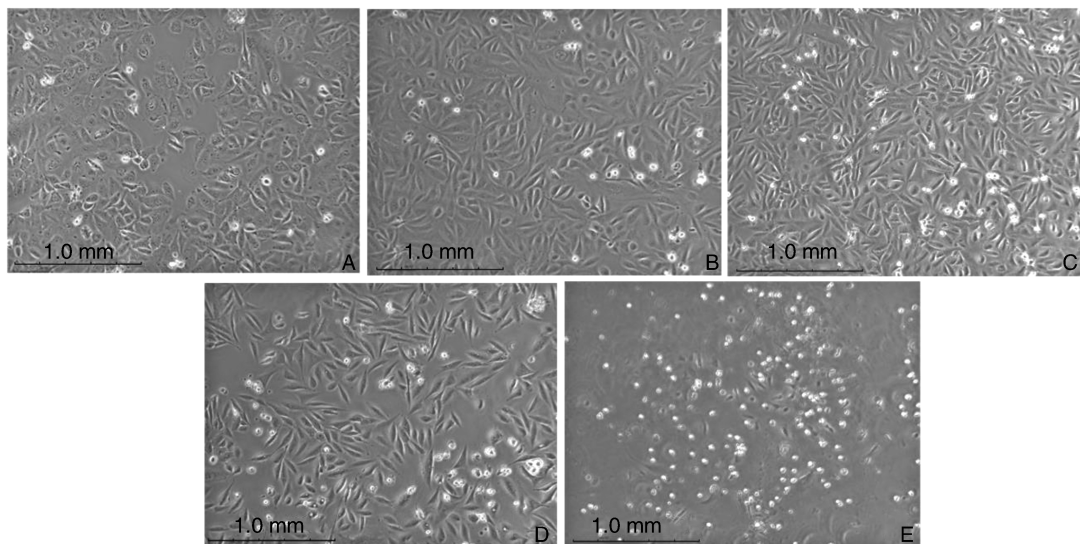


图 2. 不同低氧时间处理后 HUVEC 形态学改变

A 为 H0h 组;B 为 H4h 组;C 为 H8h 组;D 为 H16h 组;E 为 H32h 组。

Figure 2. Morphological changes of HUVEC after treatment with different hypoxic time

2.1.3 不同低氧时间细胞存活率 CCK-8 结果显示,相较于 H0h 组,H8h 组细胞存活率明显增高;而与 H8h 组进行对比,H16h 组和 H32h 组细胞存活率显著降低。提示在低氧时间较短时,细胞继续增殖,而随着低氧时间的继续延长,细胞存活率显著下降(图 3)。

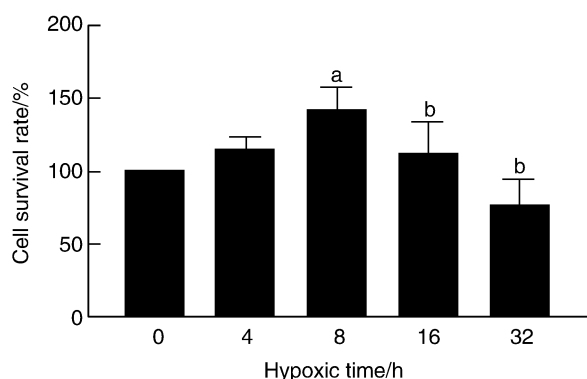


图 3. 不同低氧时间处理后 HUVEC 存活率变化 ($n=3$)

a 为 $P<0.01$,与 H0h 组比较;b 为 $P<0.01$,与 H8h 组比较。

Figure 3. Changes of HUVEC survival rate after treatment with different hypoxic time ($n=3$)

2.1.4 不同低氧时间 LDH 活性变化 ELISA 检测细胞上清液中 LDH 活性,结果显示,相较于 H0h 组,H8h 组上清液中 LDH 活性降低;而与 H8h 组比较,H16h 组、H32h 组上清液中 LDH 活性明显升高。提示随着低氧时间的延长,所造成的细胞损伤进一步加重(图 4)。

根据上述实验结果,选择低氧 16 h 作为最佳低氧处理时间。

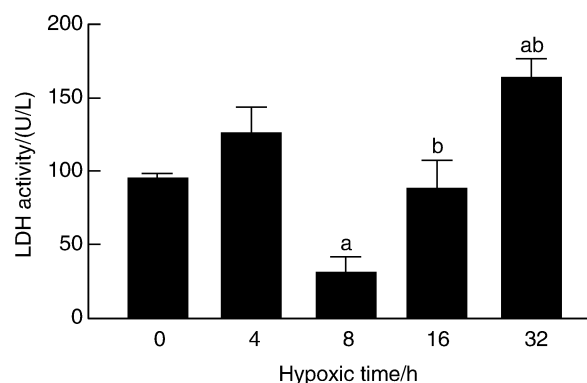


图 4. 不同低氧时间处理后 HUVEC 上清液 LDH 活性变化 ($n=3$)

a 为 $P<0.01$,与 H0h 组比较;b 为 $P<0.01$,与 H8h 组比较。

Figure 4. Changes of LDH activity in HUVEC supernatant after treatment with different hypoxic time ($n=3$)

2.2 最佳复氧时间的确定

2.2.1 不同复氧时间细胞形态学改变 倒置显微镜下显示,R1h 组、R2h 组、R3h 组的细胞密度逐渐降低,漂浮细胞逐渐增多。而随着复氧时间的进一步加长,R4h 组、R5h 组、R6h 组的细胞密度又会逐渐增高,细胞形态趋于正常。提示 R3h 组细胞的低氧复氧性损伤较大(图 5)。

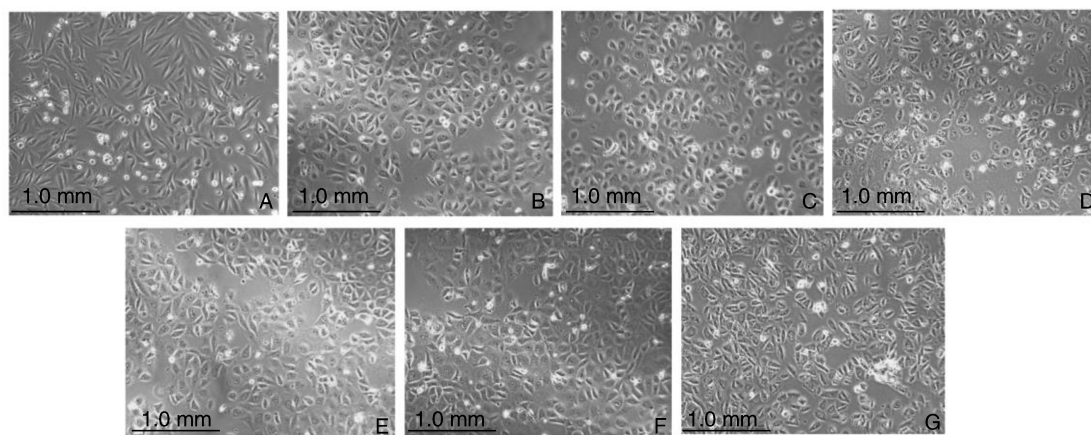


图 5. 不同复氧时间处理后 HUVEC 形态学改变

A 为 R0h 组;B 为 R1h 组;C 为 R2h 组;D 为 R3h 组;E 为 R4h 组;F 为 R5h 组;G 为 R6h 组。

Figure 5. Morphological changes of HUVEC after treatment with different reoxygenation time

2.2.2 不同复氧时间细胞存活率 CCK-8 实验 结果显示,R2h 组、R3h 组、R4h 组细胞存活率均低

于 R0h 组,特别是 R3h 组细胞存活率显著降低,但随着复氧时间进一步延长,细胞存活率逐渐升高(图 6)。

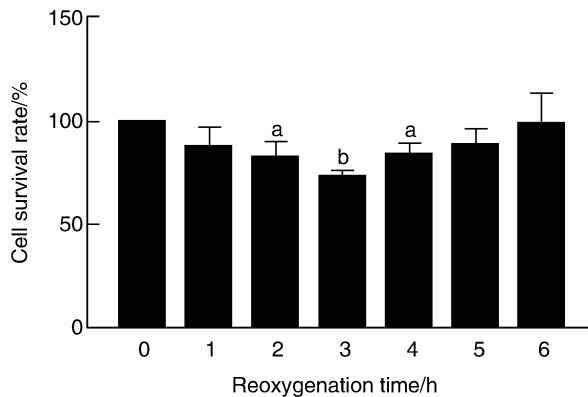


图 6. 不同复氧时间处理后 HUVEC 存活率变化 ($n=3$)

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与 R0h 组比较。

Figure 6. Changes of HUVEC survival rate after treatment with different reoxygenation time ($n=3$)

2.2.3 不同复氧时间 LDH 活性变化 通过采用 ELISA 检测细胞上清液中 LDH 活性,结果显示,R2h 组、R3h 组、R4h 组、R5h 组 LDH 活性均较 R0h 组上升,尤其是 R3h 组 LDH 活性升高最明显。提示低氧后复氧可使细胞上清液中 LDH 活性逐渐增高,而随着时间的进一步延长,由于细胞趋于正常而使升高的 LDH 活性逐渐回落(图 7)。

根据上述实验结果,选择复氧 3 h 作为最佳复氧时间。

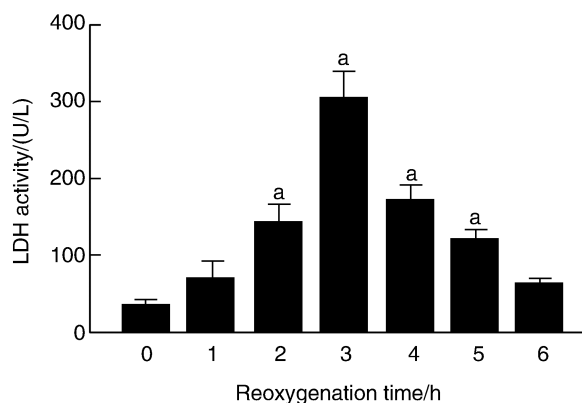


图 7. 不同复氧时间处理后 HUVEC 上清液 LDH 活性变化 ($n=3$)

a 为 $P<0.01$, 与 R0h 组比较。

Figure 7. Changes of LDH activity in HUVEC supernatant after treatment with different reoxygenation time ($n=3$)

3 讨论

组织缺血后实施复灌的过程中,慢复流或无复流是否出现及其程度可以影响缺血再灌注之后的预后。慢复流或无复流的发生与血管内皮细胞,尤其是微血管内皮细胞在缺血再灌注时的功能变化相关,因此,采用内皮细胞建立可靠的低氧复氧损伤模型是从细胞水平探讨慢复流发生机制所必需的实验手段。本实验在建模的过程中发现,在体微血管内皮细胞不仅获取效率低下,难以培养,而且鉴定过程较为复杂,所需经济成本较高。而 HUVEC 与之有相似的生理特性,在获取、培养及经济成本方面有着不可比拟的优势,因此本研究选择采用 HUVEC 进行模型的构建。

目前用于缺氧的所有方法中,化学性方法采用氯化钴或 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 等作为氧清除剂,但其具有毒性,且化学性质不稳定;物理性方法中的液体石蜡封闭法,尽管易于获取,操作也较为简单,但存在镜下易受油滴干扰而影响视野的弊端;厌氧袋法虽无毒无害且密闭性好,但无法保证长时间的缺氧效果;安宁包法虽价格低廉,但无法确定氧气浓度保证缺氧效果。而三气培养箱采取 N_2 、 CO_2 、 O_2 三种气体以不同比例混合供给,可以精确地调控并监测氧气浓度,稳定性强,操作简便,可重复性高,因而可提供一个可靠的低氧环境。本实验采用含 5% O_2 的混合气来制备低氧复氧损伤模型,相较于常规的采用含 1%~2% O_2 的混合气制备低氧复氧损伤模型,更能模拟在体的慢复流损伤,旨在为慢复流机制的研究提供方便快捷、高效稳定的细胞模型。

HUVEC 出现损伤时其细胞的形态、功能、生理生化指标以及细胞的存活率将受到直接影响。水溶性四唑盐 (WST-8) 可以被线粒体内的一些脱氢酶还原生成橙黄色的甲臌,而 CCK-8 是基于 WST-8 而广泛应用于细胞增殖和细胞毒性的快速且高灵敏度检测的方法。HIF-1 只有在低氧条件下才可稳定表达,其 α 亚基是调节细胞对低氧反应的主要转录因子,对缺血后血管形成、细胞代谢、细胞存活等方面起到重要作用。LDH 是机体能量代谢中的一种重要酶,是细胞代谢和能量传递的重要物质,细胞培养液中 LDH 的活性可以反映出细胞的损伤程度。本实验采取倒置显微镜观察细胞形态的同时采用以上 3 种方法对细胞的损伤程度进行检测,以期获得最适低氧复氧损伤模型。

本实验结果显示, HIF-1 α 的蛋白表达随 HUVEC 低氧时间的延长而逐渐升高,细胞存活率也

在出现低氧适应性增长之后逐渐降低,并且该结果与镜下形态学观察一致:在低氧处理进行的短时间里,细胞不仅未出现明显损伤,反而出现适应性增殖;而低氧 16 h 后,细胞的形态出现较大改变,贴壁细胞减少,漂浮死细胞增多。这说明细胞可通过自身调节来适应低氧性环境。实验结果还显示:LDH 活性在低氧 8 h 出现了明显下降,说明细胞正处于增殖高峰而未出现明显损伤,其结果与 CCK-8 的结果相一致;而在低氧 16 h 甚至更长时间之后,LDH 活性逐渐增高,表明其损伤开始出现并愈为严重。因此,本实验选择低氧 16 h 作为最佳低氧处理时间。

通过观察细胞不同复氧时间的动态变化,发现在经历 16 h 低氧损伤后,复氧的细胞存活率先随时间逐渐降低,并在复氧 3 h 达到最低值,具体表现为细胞存活率明显降低及上清液中 LDH 明显升高;之后随着复氧时间的延长,细胞存活率开始回升及上清液中 LDH 回降。说明复氧 3 h 细胞受到低氧复氧的损伤最明显。牛其芳等^[12]制备的内皮细胞缺氧复氧模型发现,随着复氧时间的延长,细胞损伤会加重。本实验结果与其结果不同,说明低氧复氧对内皮细胞的损伤轻于缺氧复氧对内皮细胞的损伤,其机制可能与供氧浓度的高低有关。

综上所述,本方法通过对低氧及复氧时间两个因素进行把控,分别设置了低氧及复氧的时间梯度,从而得到了具说服力的低氧复氧损伤模型,可以稳定且较好地模拟低氧复氧损伤过程。就整个操作过程和效果而言,利用三气培养箱构建内皮细胞的低氧复氧损伤模型,具有方便、可重复性高、易于观察等优点,能在慢复流的发生机制以及干预研究中提供有利帮助。

[参考文献]

[1] ZHANG Y, WANG Y, XU J, et al. Melatonin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via improving mito-

chondrial fusion/mitophagy and activating the AMPK-OPA1 signaling pathways[J]. J Pineal Res, 2019, 66(2): e12542.

- [2] ZHOU H, MA Q, ZHU P, et al. Protective role of melatonin in cardiac ischemia-reperfusion injury: from pathogenesis to targeted therapy[J]. J Pineal Res, 2018. DOI: 10.1111/jpi.12471.
- [3] 谭凤梅, 韦星, 颜姝, 等. 内皮细胞损伤与心肌无复流现象[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(1): 89-92.
- [4] 项和立, 薛武军, 侯军, 等. 重组 hCGP α 腺病毒对人肾小管上皮细胞(HK-2)缺氧再复氧损伤的保护作用[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2006, 22(4): 472-474.
- [5] YANG L, WU J, XIE P, et al. Sevoflurane postconditioning alleviates hypoxia-reoxygenation injury of cardiomyocytes by promoting mitochondrial autophagy through the HIF-1/BNIP3 signaling pathway[J]. PeerJ, 2019, 7: e7165.
- [6] 刘飞, 付微, 乔陆明, 等. 快速建立心肌细胞低氧/复氧损伤模型的方法[J]. 牡丹江医学院学报, 2017, 38(2): 1-5.
- [7] 张春燕, 肖斌, 邵军, 等. 人参皂甙对缺氧复氧致肾小管上皮细胞损伤保护作用的蛋白质组学分析[J]. 西南医科大学学报, 2019, 42(3): 207-210.
- [8] 李梦妮, 董文斌, 曹敏, 等. 复方丹参注射液减轻低氧/复氧性 HK-2 细胞损伤的作用及机制[J]. 中国当代儿科杂志, 2007, 9(6): 559-562.
- [9] WANG J K, BAI T, MA H, et al. Propofol attenuates human proximal renal tubular epithelial cell injury induced by anoxia-reoxygenation[J]. Lab Med, 2008, 39(6): 356-360.
- [10] 杜玉颖, 孟思妤, 常莉, 等. 两种不同方法建立 H9C2 心肌细胞缺氧复氧损伤模型比较[J]. 临床军医杂志, 2019, 47(4): 357-359.
- [11] GUAN F, YU B, QI G X, et al. Chemical hypoxia-induced glucose transporter-4 translocation in neonatal rat cardiomyocytes[J]. Arch Med Res, 2008, 39(1): 52-60.
- [12] 牛其芳, 李德龙, 杨杨, 等. 人血管内皮细胞缺氧复氧损伤细胞模型的建立[J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2019, 17(4): 295-299.

(此文编辑 曾学清)