

CLIC1通过干扰线粒体动力学平衡 促进内皮细胞损伤的研究

任广岩 祝骥 王萃 卢德赵*

(浙江中医药大学生命科学院, 杭州 310053)

摘要 该文通过研究H₂O₂诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)中氯离子通道蛋白1(chloride intracellular channel 1, CLIC1)对线粒体动力学平衡的影响, 探讨CLIC1在内皮细胞损伤中的作用及机制。体外培养HUVEC细胞, 分别用CLIC1抑制剂IAA94(40 μmol/L)、H₂O₂(0.9 mmol/L)、IAA94(40 μmol/L)和H₂O₂(0.9 mmol/L)联合处理, 荧光法检测细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量; JC-1染色法检测细胞线粒体膜电位的变化; 定量PCR技术检测CLIC1、线粒体动力相关蛋白1(dynamin-related protein 1, *Drp1*)以及线粒体融合蛋白1(mitofusin 1, *Mfn1*)的mRNA表达; 免疫印迹技术检测CLIC1、Drp1蛋白的水平。结果显示: 与正常组相比, H₂O₂处理的内皮细胞中ROS、MDA含量增加($P < 0.05$), CLIC1表达量上调($P < 0.05$), 三磷酸腺苷(ATP)含量减少($P < 0.05$), 线粒体膜电位降低($P < 0.001$), 线粒体融合蛋白Mfn1表达显著降低($P < 0.05$), 线粒体分裂蛋白Drp1表达显著升高($P < 0.05$); 而IAA94预处理2 h后, 内皮细胞中ROS、MDA含量减少($P < 0.05$), 线粒体融合蛋白Mfn1表达显著增加($P < 0.05$), 线粒体分裂蛋白Drp1表达显著降低($P < 0.05$), 线粒体膜电位升高($P < 0.001$)。以上结果表明, CLIC1在H₂O₂诱导的内皮细胞线粒体损伤中发挥重要作用, 其机制可能与CLIC1干扰线粒体动力学平衡有关。

关键词 氯离子通道蛋白1; 线粒体动力学平衡; 内皮细胞损伤

Chloride Intracellular Channel 1 Promotes Endothelial Injury by Disturbing Mitochondrial Dynamic Balance

Ren Guangyan, Zhu Ji, Wang Cui, Lu Dezhao*

(College of Life Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract This work studied the effect of chloride intracellular channel 1 (CLIC1) on H₂O₂ induced mitochondrial dynamics in human umbilical vein endothelial cells, and investigated the function and mechanism of CLIC1 in endothelial injury. For preparation, the human umbilical vein endothelial cells were treated with the specific inhibitor indanyloxyacetic acid 94 (IAA94) (40 μmol/L), H₂O₂ (0.9 mmol/L) and H₂O₂ (0.9 mmol/L) combined with IAA94 (40 μmol/L), respectively. The content of reactive oxygen species and MDA were determined by fluorescence method. Membrane potential was determined by JC-1. The mRNA expression of *CLIC1*, *Drp1* and *Mfn1* were determined by qPCR. The protein level of CLIC1 and Drp1 were determined by Western blot. The results showed that H₂O₂ could increase the content of oxidative damage factor ROS, MDA and CLIC1 ($P < 0.05$) compared with the control group. The level of ATP ($P < 0.05$) and membrane potential ($P < 0.001$) were significantly

收稿日期: 2018-05-14 接受日期: 2018-07-17

国家自然科学基金(批准号: 81403133)资助的课题

*通讯作者。Tel: 1358876915, E-mail: ludezhao@126.com

Received: May 14, 2018 Accepted: July 17, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81403133)

*Corresponding author. Tel: +86-1358876915, E-mail: ludezhao@126.com

网络出版时间: 2018-09-26 17:16:25

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180926.1716.008.html>

reduced in HUVEC treated by H_2O_2 . Moreover, the mRNA and protein expression level of mitochondrial division protein ($P<0.05$) was elevated while fusion protein ($P<0.05$) was reduced significantly. However, after 2 h pretreatment of IAA94, the expression of mitochondrial division protein ($P<0.05$) was decreased while fusion protein ($P<0.05$) was increased, membrane potential ($P<0.001$) were significantly increased, the content of SOD and MDA ($P<0.001$) were reduced. In conclusion, CLIC1 plays an important role in mitochondrial injury of endothelial cells induced by H_2O_2 and its mechanism may be related to the interference of the mitochondrial dynamic balance.

Keywords CLIC1; mitochondrial dynamics balance; endothelial injury

氯离子通道蛋白1(chloride intracellular channel 1, CLIC1)是CLIC家族中的一种含241个氨基酸的蛋白质。氯离子通道蛋白1主要以可溶的形式存在于细胞质和核质中,但在受到氧化等刺激时,CLIC1构象改变并插入到脂膜中而形成氯化物选择性离子通道,因此被研究者视为细胞氧化的传感器和效应器^[1]。我们在前期研究中发现,CLIC1在内皮细胞氧化损伤中发挥重要作用,但其机制尚未明确。

线粒体是细胞内涉及氧化调控及能量代谢的重要细胞器,在维持内皮细胞功能中发挥了重要的作用^[2]。它是一种高度动态变化的细胞器,通过不断地融合/分裂维持线粒体网络的稳态,线粒体融合和分裂的动态过程称为线粒体动力学^[3]。在正常生理条件下,内皮细胞的线粒体动力学处于稳定动态平衡状态。但在氧化应激的情况下,线粒体融合和(或)分裂相关因子的表达发生改变,导致细胞融合/分裂出现异常,继而影响内皮细胞功能^[4]。

现有研究表明,一些化学物质或环境因素可以通过诱导线粒体融合/分裂异常,而引起内皮细胞功能障碍。马尿酸通过激活Drp1引起线粒体分裂异常,减少eNOS表达,并增加ICAM-1、vWF表达及氧化应激产物ROS的产生,进而促进内皮细胞功能障碍^[5]。环境污染物二氧化硅纳米粒子进入线粒体后,引起线粒体分裂蛋白(Drp1或Fis1)表达增高异常,融合蛋白(Opa1)表达减少,引起线粒体过度裂变,线粒体动态平衡出现异常。线粒体ROS含量升高,导致膜电位降低,ATP合成出现障碍,最终导致内皮细胞出现功能障碍^[4]。

本研究旨在探讨在 H_2O_2 诱导下CLIC1过表达是否能诱导线粒体动力学失衡,进而促进内皮细胞的氧化损伤。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人脐静脉内皮细胞HUVEC购于中国科学院上海细胞库; H_2O_2 购于美国Sigma公司; DMEM高糖培养基(批号: 2017022705)购于杭州吉诺生物医药技术有限公司; 胎牛血清(批号: 150208)购于杭州四季青生物工程材料有限公司; JC-1线粒体膜电位检测试剂盒(批号: 2017062108)购于江苏凯基生物技术股份有限公司; 活性氧检测试剂盒(批号: 12145)购于碧云天生物技术公司; CLIC1小鼠单克隆抗体(批号: L0815)购于Santa Cruz公司; 抗 β -actin鼠单克隆抗体(批号: 40121)、高灵敏度化学发光检测试剂盒(批号: 30223)、兔二抗(批号: 10147)、鼠二抗(批号: 10146)、Trizon Reagent(批号: 0387760223)、去基因组cDNA第一链合成试剂盒(批号: 30147)、UltraSYBR Mixture(High ROX)(批号: 20151)均购于康为世纪生物科技有限公司; IAA94(批号: 084M4606V)购于美国Sigma公司; FITC(批号: nf2604)购于美国Earthox公司。

1.2 仪器与设备

5427R低温高速离心机购自德国Eppendorf公司; 全波长光吸收酶标仪购自美国Molecular Devices公司; 尼康Ti-S倒置显微镜购自日本尼康公司; 化学发光成像系统购自上海勤翔科学仪器有限公司; 3111 CO_2 培养箱购自美国Thermo Fisher Scientific公司; DMI8荧光显微镜购自德国Leica公司; Stepone plus荧光定量PCR仪购自美国ABI公司; Quawell Q5000微量紫外可见分光光度计购自美国Quawell公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 HUVEC细胞悬于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养液中,置于37 $^{\circ}C$ 、5% CO_2 培养箱中培养。取生长良好的细胞用0.25%的胰蛋白酶消化成均匀的细胞悬液,调整细胞密度至每毫升

表1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	大小(bp) Long (bp)
<i>β-actin</i>	Forward: 5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGAA-3'	193
	Reverse: 5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3'	
<i>CLIC1</i>	Forward: 5'-AAT CAA ACC CAG CAC TCA ATG-3'	145
	Reverse: 5'-CAG CAC TGG TTT CAT CCA CTT-3'	
<i>Drp-1</i>	Forward: 5'-GAT GCC ATA GTT GAA GTG GTG AC-3'	112
	Reverse: 5'-CCA CAA GCA TCA GCA AAG TCT GG-3'	
<i>Mfn1</i>	Forward: 5'-AGA CTG AGC TGG ACC ACC CAT G-3'	178
	Reverse: 5'-TTA GGA TTC ATT GCT TGA AGG TAG A-3'	
<i>ICAM-1</i>	Forward: 5'-TGA AGG CCG CCC CAG AGG ACA AC-3'	181
	Reverse: 5'-CCC ATT ATG ACT GCG GCT GCT GCT ACC-3'	
<i>VCAM-1</i>	Forward: 5'-CCC TTG ACC GGC TGG AGA TT-3'	149
	Reverse: 5'-CTG GGG GCA ACA TTG ACA TAA AGT G-3'	

2.5×10⁵个,接种于6孔培养板中,每孔2 mL,在37 °C、5% CO₂的培养箱内培养24 h后分为以下4组: H₂O₂处理组(用0.9 mmol/L H₂O₂处理HUVEC细胞12 h)、IAA94阴性对照组(用40 μmol/L IAA94处理HUVEC细胞2 h)、IAA94预处理组(用40 μmol/L的IAA94预处理HUVEC细胞2 h再加入0.9 mmol/L H₂O₂继续作用12 h)、正常组(有等量的培养液培养HUVEC细胞)。

1.3.2 ROS含量测定 无血清培养液清洗细胞后,按照1:1 000用无血清培养液稀释DCFH-DA,使终浓度为10 μmol/L。去除细胞培养液,加入1 mL稀释好的DCFH-DA,37 °C细胞培养箱孵育20 min。用无血清细胞培养液洗涤贴壁细胞3次,以充分去除未进入细胞内的DCFH-DA。分别在荧光显微镜FITC下观察细胞荧光情况,并使用荧光酶标仪在488 nm激发波长,525 nm发射波长下检测活性氧水平。

1.3.3 细胞线粒体膜电位检测 PBS洗涤细胞2次,取100 μL 10×Incubation Buffer加900 μL灭菌去离子水稀释成1×Incubation Buffer,混匀并预热至37 °C。吸取500 μL 1×Incubation Buffer并加入1 μL JC-1,涡旋混匀配成JC-1工作液。取500 μL JC-1工作液加入12孔板,37 °C、5% CO₂的细胞培养箱孵育20 min,随后用1 mL 1×Incubation Buffer洗2次。在荧光显微镜下观察细胞,并使用荧光酶标仪在525 nm激发波长,590 nm发射波长下检测膜电位水平。

1.3.4 荧光定量PCR检测 按照Trizol试剂盒说明

书提取各组细胞RNA,每组设3个复孔,并按照逆转录试剂盒说明书将各组RNA逆转录成cDNA,将逆转录产物进行PCR扩增。引物序列见表1。反应条件为:95 °C 10 min;95 °C 15 s,60 °C 60 s,40个循环。调整基线和阈值读出各孔的循环数(Ct)。利用比较Ct法检测个样本*CLIC1*、*Drp1*、*ICAM-1*、*VCAM-1* mRNA的表达情况。倍增变化率=2^{-ΔΔCt}(ΔΔCt=目的基因ΔCt-内参基因ΔCt)。

1.3.5 MDA含量检测 细胞用预冷的PBS清洗3次,细胞刮刀轻轻刮下细胞,收集至1.5 mL的EP管中,每组加入300 μL RIPA裂解液置于4 °C裂解30 min后,4 °C 12 000 r/min离心30 min。参照脂质氧化(MDA)和总SOD活性检测试剂盒操作说明书,测定细胞内MDA含量。

1.3.6 ATP以及ATP酶检测 细胞刮刀轻轻刮下细胞,收集至1.5 mL EP管中,先离心处理将细胞和培养液分离除去培养上清,得到下层沉淀细胞,将收集好的细胞加入300 μL热双蒸水,置于热水浴100 °C中匀浆破碎,后将细胞悬液于沸水浴中加热10 min,取出后涡旋混匀抽提1 min,按说明书方法进行操作后,室温静置5 min,波长636 nm,光径0.5 cm,双蒸水调零,测定各管吸光度值。

1.4 统计学分析

采用GraphPad Prism 6.0软件对数据进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用t检验,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

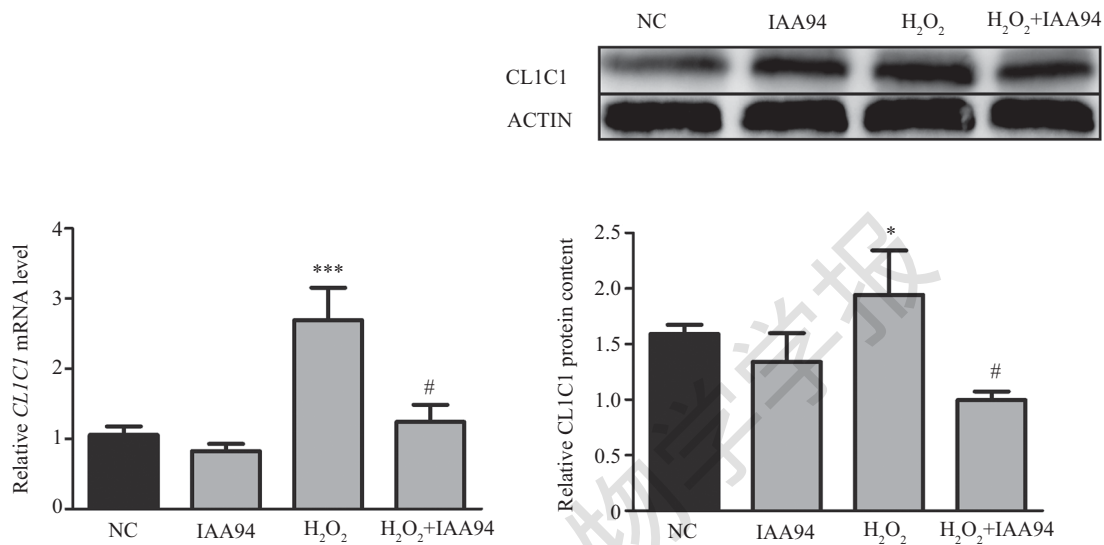
2.1 H₂O₂诱导内皮细胞中CLIC1表达

在0.9 mmol/L的H₂O₂作用HUVEC细胞12 h后, CLIC1的mRNA和蛋白表达量均明显升高($P<0.001$, $P<0.05$)。与H₂O₂处理组相比, 用40 μmol/L CLIC1抑制剂IAA94预处理细胞2 h后再用H₂O₂处理的细胞中,

CLIC1的mRNA和蛋白表达量显著降低($P<0.05$)(图1)。

2.2 CLIC1的干预可抑制内皮细胞的氧化损伤

如图2所示, 与正常组比较, H₂O₂处理组HUVEC细胞中ROS和MDA生成明显增加($P<0.001$, $P<0.05$)。与H₂O₂处理组相比, IAA94预处理组内皮细胞中ROS和MDA含量均明显下降($P<0.001$, $P<0.05$)。这

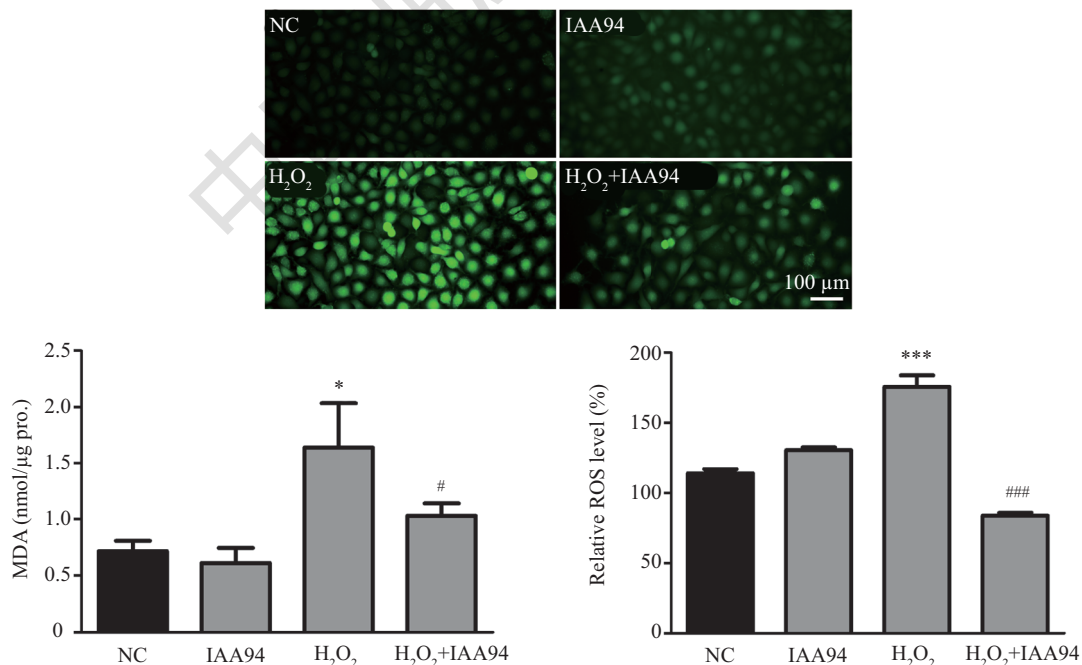


* $P<0.05$, *** $P<0.001$, 与NC组比较; # $P<0.05$, 与H₂O₂组比较。

* $P<0.05$, *** $P<0.001$ compared with NC group; # $P<0.05$ compared with H₂O₂ group.

图1 H₂O₂对内皮细胞中CLIC1表达的影响

Fig.1 Effect of H₂O₂ on expression of CLIC1 in HUVEC



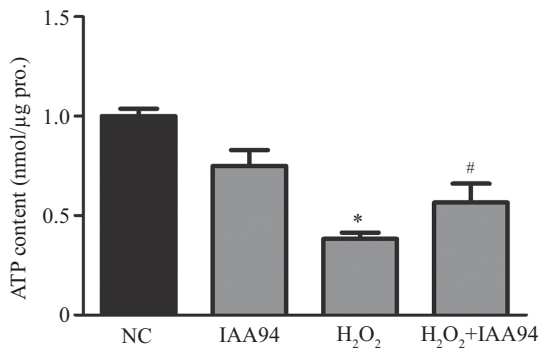
ROS为绿色荧光标记。* $P<0.05$, *** $P<0.001$, 与NC组比较; # $P<0.05$, ### $P<0.001$, 与H₂O₂组比较。

ROS is labeled with green fluorescent. * $P<0.05$, *** $P<0.001$ compared with NC group; # $P<0.05$, ### $P<0.001$ compared with H₂O₂ group.

图2 氯离子通道蛋白1的干预可抑制内皮细胞的氧化损伤

Fig.2 The effect of CLIC1 intervention on oxidative stress in HUVEC

说明, H_2O_2 可以诱导内皮细胞的氧化损伤, 而IAA94可以减少内皮细胞ROS、MDA的水平, 缓解内皮细胞的氧化损伤。



* $P < 0.05$, 与NC组比较; # $P < 0.05$, 与 H_2O_2 组比较。

* $P < 0.05$ compared with NC group; # $P < 0.05$ compared with H_2O_2 group.

图3 氯离子通道蛋白1的抑制对内皮细胞中线粒体ATP含量的影响

Fig.3 The effect of CLIC1 intervention on content of ATP in HUVEC

2.3 抑制CLIC1提高线粒体ATP含量

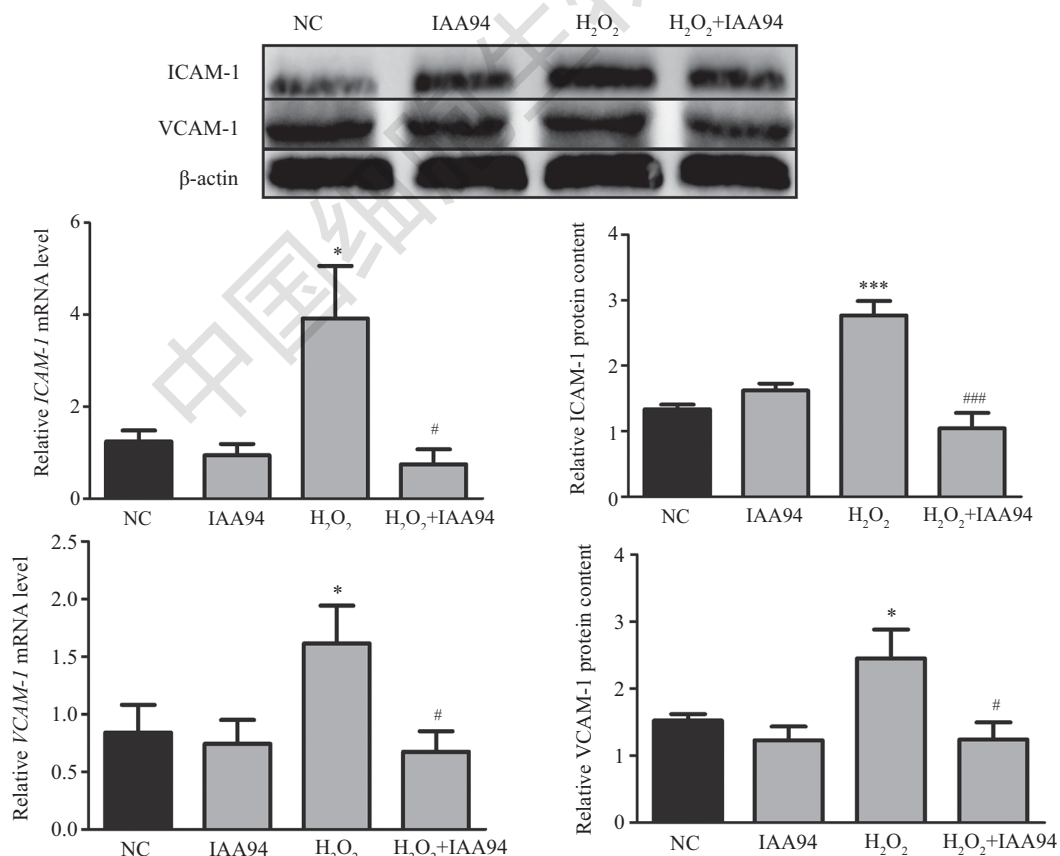
如图3所示, 与正常组比较, H_2O_2 处理组的内皮细胞中ATP含量明显降低($P < 0.05$)。与 H_2O_2 处理组比较, IAA94预处理组HUVEC细胞中ATP含量明显升高($P < 0.05$)。这说明, CLIC1过表达可能造成线粒体ATP产生障碍, 而抑制氯离子通道蛋白1可以提高线粒体ATP含量。

2.4 CLIC1对内皮细胞VCAM-1、ICAM-1表达的影响

如图4所示, 与正常组相比, H_2O_2 处理组HUVEC细胞中ICAM-1、VCAM-1的mRNA和蛋白表达明显增加($P < 0.05$, $P < 0.001$), 而CLIC1抑制剂预处理后, ICAM-1、VCAM-1蛋白表达明显降低($P < 0.05$, $P < 0.001$)。这说明, 干预氯离子通道蛋白1的表达可以抑制内皮细胞的损伤。

2.5 CLIC1调控内皮细胞中线粒体动力学平衡相关基因及蛋白的表达

如图5所示, 在0.9 mmol/L的 H_2O_2 作用HUVEC

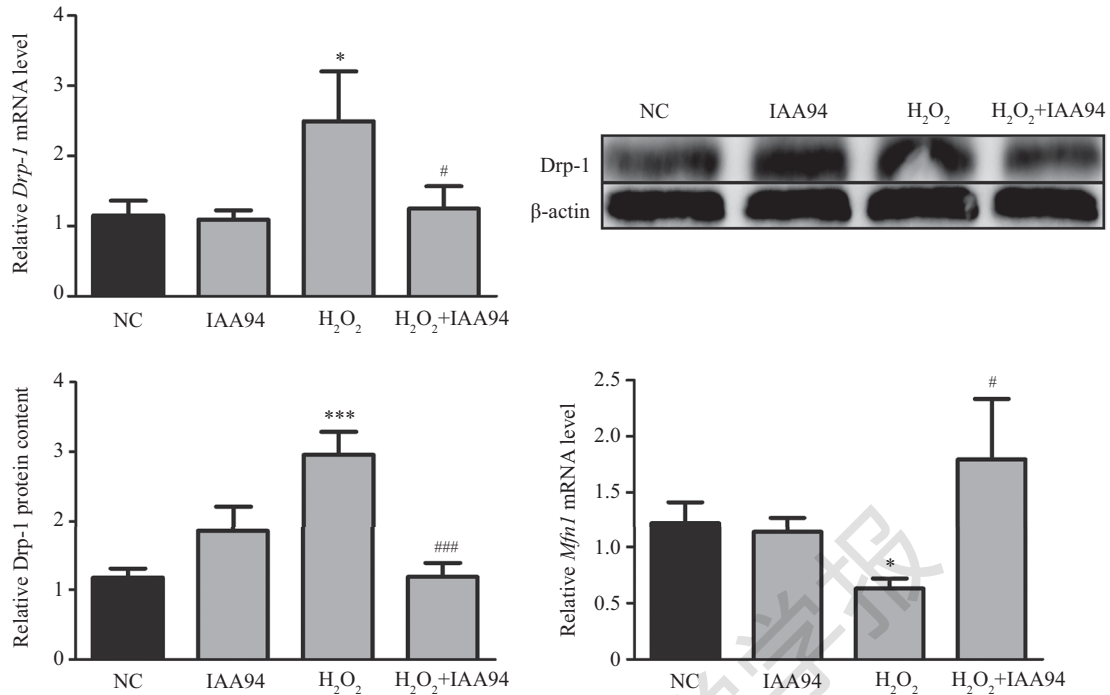


* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, 与NC组比较; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$, 与 H_2O_2 组比较。

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared with NC group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ compared with H_2O_2 group.

图4 氯离子通道蛋白1对内皮细胞VCAM-1、ICAM-1表达的影响

Fig.4 Effect of H_2O_2 on expressions of ICAM-1, VCAM-1 in HUVEC

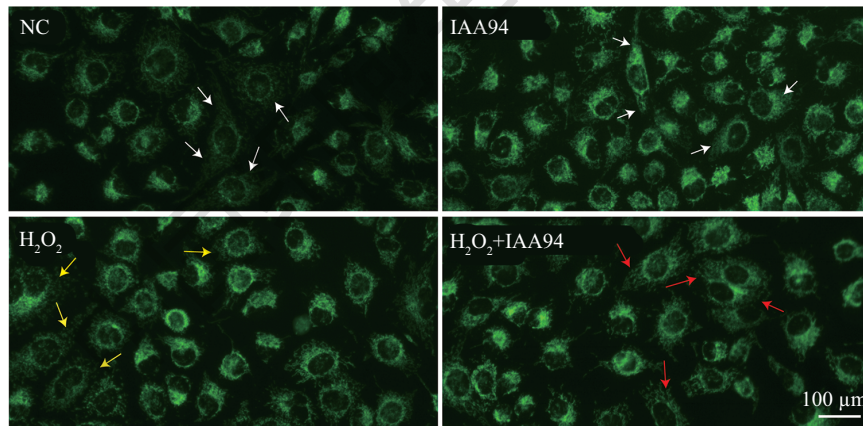


* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, 与NC组比较; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$, 与H₂O₂组比较。

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ compared with NC group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ compared with H₂O₂ group.

图5 氯离子通道蛋白1对内皮细胞中线粒体动力学平衡的影响

Fig.5 Effect of H₂O₂ on expression of mitochondrial dynamics balance in HUVEC



白色箭头: 连续长条形态的线粒体, 具有相对完整的线粒体网络形态; 黄色箭头: 圆形点状碎片形态的线粒体; 红色箭头: 恢复网状结构形态的线粒体。

White arrows: mitochondria in continuous strip form with relatively intact mitochondrial network morphology. Yellow arrows: mitochondria in the form of circular punctate fragments. Red arrows: mitochondria that restore network morphology.

图6 CLIC1的干预对内皮细胞线粒体形态的影响

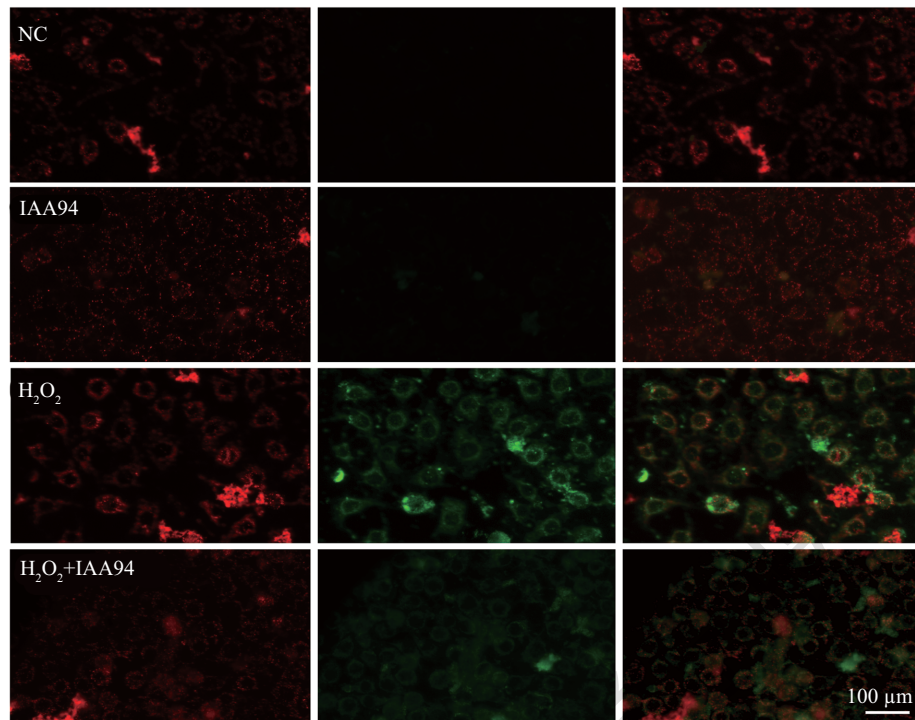
Fig.6 The effect of CLIC1 intervention on mitochondrial morphology in HUVEC

细胞12 h后, 内皮细胞中分裂蛋白*Drp1* mRNA表达明显增加($P < 0.001$, $P < 0.05$), 融合蛋白*Mfn1* mRNA表达明显降低, 与正常组相比均有显著性差异($P < 0.05$), 而用CLIC1抑制剂40 $\mu\text{mol/L}$ IAA94预处理细胞2 h后, *Drp1* mRNA表达明显降低($P < 0.001$, $P < 0.05$), 同时*Mfn1* mRNA显著增加($P < 0.05$)。这说

明, H₂O₂处理HUVEC细胞中线粒体分裂增加, 融合减少, 线粒体动力学平衡被干扰。而IAA94预处理能有效的维护线粒体动力学平衡。

2.6 CLIC1的干预恢复内皮细胞线粒体网络结构

如图6所示, 经Mito-Tracker染色后, 正常组和IAA94预处理的内皮细胞中线粒体呈现连续的长条



正常细胞为红色荧光标记,膜电位降低为绿色荧光标记。*** $P<0.001$,与NC组比较;### $P<0.001$,与H₂O₂组比较。

Normal cells is labeled with green fluorescent, decrease in membrane potential is labeled with red fluorescent. *** $P<0.001$ compared with NC group; ### $P<0.001$ compared with H₂O₂ group.

图7 CLIC1的干预对内皮细胞线粒体膜电位的影响

Fig.7 The effect of CLIC1 intervention on membrane potential in HUVEC

形态(白色箭头),具有相对完整的线粒体网络形态。而H₂O₂处理的内皮细胞中,大多数线粒体网状结构消失,形成圆形线粒体碎片,变为点状形态(黄色箭头)。在IAA94预处理2 h后再用H₂O₂处理的内皮细胞中,线粒体的网状结构恢复(红色箭头)。

2.7 CLIC1的干预对内皮细胞线粒体膜电位的影响

如图7所示,在0.9 mmol/L的H₂O₂作用HUVEC细胞12 h后,绿色荧光(FITC)明显增加,与正常组相比均有显著性差异($P<0.001$)。而用CLIC1抑制剂40 μmol/L IAA94预处理细胞2 h后,绿色荧光(FITC)明显降低,且有显著性差异($P<0.001$)。这说明,H₂O₂作用后线粒体膜电位明显降低,而IAA94预处理可

增加线粒体膜电位。

3 讨论

氯离子是机体内最为丰富的阴离子,氯离子通道(chloride channel, CLC)是一类广泛分布于有机体细胞质膜及多种细胞器中的离子通道,存在于体内多个脏器细胞中^[6]。细胞内氯离子通道(chloride intracellular channel, CLIC)是近年来新发现的一类氯离子通道,该蛋白家族已包含多个成员:CLIC1、CLIC2、CLIC3、CLIC4、CLIC5、CLIC6、p64和Parchorin^[7]。

CLIC1是一种含241个氨基酸的蛋白质^[8],在正

常情况下, CLIC1以可溶性蛋白质的形式存在于胞质和核质内,但在某些刺激物作用后,结构可以发生改变并插入脂膜充当氯离子选择性通道。细胞氧化和酸性环境是CLIC1在这两种形式间转化最重要的刺激物^[9-10]。CLIC1与还原型谷胱甘肽N-末端有一个结合位点,这被认为是CLIC1可受细胞氧化调控的结构基础。位于24位半胱氨酸和46位缬氨酸间的区域是CLIC1的跨膜区域,其插入质膜后可形成氯离子通道^[11],促使细胞外的氯离子向细胞内转运。因此,研究者将CLIC1称作为氧化应激中的传感器和效应器。

临床研究发现,细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)与AS严重性相关。在著名的HOPE研究中发现,ICAM-1和VCAM-1与未来心血管终点事件显著相关^[12]。ICAM-1和VCAM-1表达水平增加,可以引起血管内皮细胞通透性增加,内皮细胞出现功能障碍^[13]。在高血糖诱导的内皮细胞中,ICAM-1和VCAM-1表达明显增加,引起内皮细胞功能障碍以及动脉粥样硬化性血管疾病的发生^[14]。本实验也证实, H₂O₂处理HUVEC细胞后, CLIC1表达量增加,同时细胞内ROS、MDA增加, ICAM-1和VCAM-1表达升高,抑制CLIC1表达后, ROS和MDA水平降低, ICAM-1和VCAM-1表达降低,从而抑制内皮细胞的损伤。

氯离子通道不仅可转运Cl⁻,还允许I⁻、Br⁻、F⁻及NO⁻等离子通过,并以此改变细胞微环境,进而调节蛋白质与核酸、蛋白质与蛋白质的相互作用,从而影响细胞的生命活动^[15]。研究表明, CLIC1参与了许多重要的生理过程,如细胞容量的调节、细胞器的酸化及细胞器的平衡^[16-17]。

线粒体动力学是指线粒体融合和分裂的动态过程,它是维持线粒体内环境稳态的决定性因素。正常生理状态下分裂和融合处于动态平衡,线粒体动力学对心肌细胞正常的能量代谢比较关键,融合和分裂异常可以造成线粒体受损和细胞能量代谢障碍^[18]。

线粒体融合的主要调控蛋白是线粒体融合蛋白1(mitofusin 1, Mfn1)、线粒体融合蛋白2(Mfn2)和视神经萎缩症蛋白1(optic atrophy 1, Opa1)。线粒体分裂的主要调控蛋白是动力相关蛋白1(dynamin related protein 1, Drp1)和线粒体分裂蛋白(mitochondrial fission protein, Fis1)^[19]。

在生理条件下,内皮细胞的线粒体动力学处于

稳定动态平衡状态。但受到氧化应激后,线粒体融合和(或)分裂相关因子的表达发生改变,导致细胞融合/分裂出现异常,继而影响内皮细胞功能^[20]。用siRNA抑制Mfn2与Mfn1表达后,可降低内皮细胞氧化呼吸链相关基因和转录因子表达、减少线粒体对VEGF和Akt依赖的内皮NO合酶的效应,并抑制线粒体融合,从而影响血管生成^[21]。

内皮细胞线粒体融合分裂异常参与了多种心血管疾病的发生发展。内皮细胞在缺血/再灌注(I/R)损伤时,线粒体网络结构破碎, Drp1表达增加及线粒体ROS产生增多。当使用线粒体分裂抑制剂Mdivi-1抑制Drp1后, ROS产生减少,线粒体结构完整^[22]。在心肌I/R损伤的动物模型中,抑制心肌细胞Drp1表达可以保护心肌,减少心肌梗死面积^[23]。用高糖培养人主动脉内皮细胞时发现, Fis1和Drp1表达增加、线粒体网络缺失、ROS产生增加、eNOS兴奋刺激活化障碍以及环磷酸腺苷(cGMP)产生减少。当抑制Fis1和Drp1后,上述情况得到改善^[24]。本实验中用H₂O₂处理HUVEC细胞后,细胞中ROS、MDA含量增加、线粒体膜电位降低、ATP合成减少、线粒体分裂蛋白Drp1表达显著升高、融合蛋白Mfn1表达降低,说明H₂O₂扰乱线粒体动力学平衡,促进线粒体损伤,加重内皮细胞损伤。

作为血管内皮细胞损伤的标志,NO合酶也参与了CLIC1损伤内皮细胞功能的过程。用CLIC1的抑制剂IAA94处理神经胶质细胞后,可以恢复肿瘤坏死因子 α 和NO的产生,并抑制iNOS的产生,从而达到对神经元保护的作用^[25]。因此,我们推测,在内皮细胞中下调或阻断CLIC1可以抑制内皮细胞中iNOS的表达,促进NO的产生,有助于缓解内皮功能障碍。

为了探讨氯离子通道蛋白1是否在H₂O₂诱导的线粒体动力学失衡中发挥作用,我们用氯离子通道蛋白1的抑制剂IAA94对HUVEC细胞进行预处理。结果表明,与H₂O₂单独处理的HUVEC细胞比较,经IAA94预处理后再用H₂O₂诱导的细胞中,线粒体分裂蛋白Drp1表达显著降低、融合蛋白Mfn1表达增加、线粒体网络结构相对完整,线粒体膜电位升高。这说明在正常情况下,线粒体是维持一个相对完整的网络形态,线粒体融合和分裂保持相对稳定。而在H₂O₂处理后,线粒体分裂增加,碎片化严重,无法维持网络形态,而IAA94预处理有助于维护线粒体动力学平衡。这说明,氯离子通道蛋白1的抑制可以

维护线粒体动力学平衡。

综上所述, H₂O₂可以上调氯离子通道蛋白1的表达, 扰乱线粒体动力学平衡, 促使内皮细胞损伤; 干预氯离子通道蛋白1的表达可维护线粒体动力学平衡, 缓解内皮细胞损伤。

参考文献 (References)

- 1 Xu Y, Zhu J, Hu X, Wang C, Lu D, Gong C, *et al.* CLIC1 inhibition attenuates vascular inflammation, oxidative stress, and endothelial injury. *PLoS One* 2016; 11(11): e0166790.
- 2 Liu S, Soong Y, Seshan SV, Szeto HH. Novel cardiolipin therapeutic protects endothelial mitochondria during renal ischemia and mitigates microvascular rarefaction, inflammation, and fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 306(9): F970-80.
- 3 Lennon FE, Salgia R. Mitochondrial dynamics: biology and therapy in lung cancer. *Expert Opin Inv Drug* 2014; 23(5): 675-92.
- 4 Guo C, Wang J, Jing L, Ma R, Liu X, Gao L, *et al.* Mitochondrial dysfunction, perturbations of mitochondrial dynamics and biogenesis involved in endothelial injury induced by silica nanoparticles. *Environ Pollut* 2018; 236: 926-36.
- 5 Huang M, Wei R, Wang Y, Su T, Li P, Chen X. The uremic toxin hippurate promotes endothelial dysfunction via the activation of Drp1-mediated mitochondrial fission. *Redox Bio* 2018; 16: 303-13.
- 6 Wei X, Li J, Xie H, Wang H, Wang J, Zhang X, *et al.* Chloride intracellular channel 1 participates in migration and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting maspin. *J Gastroen Hepatol* 2015; 30(1): 208-16.
- 7 Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebek AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev* 2002; 82(2): 503-68.
- 8 Valenzuela SM, Martin DK, Por SB, Robbins JM, Warton K, Bootcov MR, *et al.* Molecular cloning and expression of a chloride ion channel of cell nuclei. *J Biol Chem* 1997; 272(19): 12575-82.
- 9 Littler DR, Harrop SJ, Fairlie WD, Brown LJ, Pankhurst GJ, Pankhurst S, *et al.* The intracellular chloride ion channel protein CLIC1 undergoes a redox-controlled structural transition. *J Biol Chem* 2004; 279(10): 9298-305.
- 10 Singh H, Ashley RH. Redox regulation of CLIC1 by cysteine residues associated with the putative channel pore. *Biophys J* 2006; 90(5): 1628-38.
- 11 Dulhunty A, Gage P, Curtis S, Chelvanayagam G, Board P. The glutathione transferase structural family includes a nuclear chloride channel and a ryanodine receptor calcium release channel modulator. *J Biol Chem* 2001; 276(5): 3319-23.
- 12 Smieja M, Gnarpe J, Lonn E, Gnarpe H, Olsson G, Yi Q, *et al.* Multiple infections and subsequent cardiovascular events in the Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Study. *Circulation* 2003; 107(2): 251-7.
- 13 Yu H, Jiang W, Du H, Xing Y, Bai G, Zhang Y, *et al.* Involvement of the Akt/NF-kappaB pathways in the HTNV-mediated increase of IL-6, CCL5, ICAM-1, and VCAM-1 in HUVECs. *PLoS One* 2014; 9(4): e93810.
- 14 Altannavch TS, Roubalova K, Kucera P, Anel M. Effect of high glucose concentrations on expression of ELAM-1, VCAM-1 and ICAM-1 in HUVEC with and without cytokine activation. *Physiol Res* 2004; 53(1): 77-82.
- 15 Jentsch TJ. CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. *Crit Rev Biochem Mol* 2008; 43(1): 3-36.
- 16 Jiang L, Salao K, Li H, Rybicka JM, Yates RM, Luo XW, *et al.* Intracellular chloride channel protein CLIC1 regulates macrophage function through modulation of phagosomal acidification. *J Cell Sci* 2012; 125(22): 5479-88.
- 17 Skaper SD, Facci L, Giusti P. Intracellular ion channel CLIC1: involvement in microglia-mediated beta-amyloid peptide (1-42) neurotoxicity. *Neurochem Res* 2013; 38(9): 1801-8.
- 18 Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* 2003; 23(15): 5409-20.
- 19 Liesa M, Shirihai OS. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab* 2013; 17(4): 491-506.
- 20 Jendrach M, Mai S, Pohl S, Voth M, Bereiter-Hahn J. Short- and long-term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress. *Mitochondrion* 2008; 8(4): 293-304.
- 21 Lugus JJ, Ngoh GA, Bachschmid MM, Walsh K. Mitofusins are required for angiogenic function and modulate different signaling pathways in cultured endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 51(6): 885-93.
- 22 Giedt RJ, Yang C, Zweier JL, Matzavinos A, Alevriadou BR. Mitochondrial fission in endothelial cells after simulated ischemia/reperfusion: role of nitric oxide and reactive oxygen species. *Free Radical Bio Med* 2012; 52(2): 348-56.
- 23 Sharp WW. Dynamin-related protein 1 as a therapeutic target in cardiac arrest. *J Mol Med (Berl)* 2015; 93(3): 243-52.
- 24 Shenouda SM, Widlansky ME, Chen K, Xu G, Holbrook M, Tabit CE, *et al.* Altered mitochondrial dynamics contributes to endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circulation* 2011; 124(4): 444-53.
- 25 Paradisi S, Matteucci A, Fabrizi C, Denti MA, Abeti R, Breit SN, *et al.* Blockade of chloride intracellular ion channel 1 stimulates Abeta phagocytosis. *J Neurosci Res* 2008; 86(11): 2488-98.