

DOI:10.3724/SP.J.1008.2013.00344

氧糖剥夺损伤后细胞上清中 IL-1 促进正常血管平滑肌细胞增殖及迁移

孟亮^{1*}, 许炜东², 邢昌明³, 蒋红军⁴

- 1. 沈阳医学院奉天医院心内科, 沈阳 110024
- 2. 沈阳医学院奉天医院科教科, 沈阳 110024
- 3. 沈阳医学院奉天医院骨外科, 沈阳 110024
- 4. 沈阳医学院奉天医院放射科, 沈阳 110024

[关键词] 血管平滑肌; 氧糖剥夺; 白介素 1; 细胞增殖; 细胞运动

[中图分类号] R 331.32 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2013)03-0344-04

IL-1 released from oxygen-glucose deprivation damage cells promotes proliferation and migration of normal vascular smooth muscle cells

MENG Liang^{1*}, XU Wei-dong², XING Chang-ming³, JIANG Hong-Jun⁴

- 1. Department of Cardiology, Fengtian Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang 110024, Liaoning, China
- 2. Department of Science and Education, Fengtian Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang 110024, Liaoning, China
- 3. Department of Bone Surgery, Fengtian Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang 110024, Liaoning, China
- 4. Department of Radiology, Fengtian Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang 110024, Liaoning, China

[Key words] vascular smooth muscle; oxygen-glucose deprivation; interleukin-1; cell proliferation; cell movement

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2013, 34(3): 344-347]

血管平滑肌细胞(VSMC)的过度增殖和迁移是多种心血管疾病共同的病理基础。VSMC不仅具有调节血管收缩的作用,同时还参与细胞外基质的合成与分泌,进而影响血管功能^[1-2]。近来有研究表明,坏死的VSMC能够释放细胞因子等活性物质,激活VSMC表面受体,引起一系列的信号转导,从而促进周围正常VSMC的增殖和迁移^[3-4]。我们在前期工作中发现氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)损伤后的VSMC上清液中白介素 1(IL-1)含量显著增加^[5],证明损伤的VSMC能够释放炎症因子,但其是否能够对周围细胞产生影响以及IL-1在其中的作用如何仍未明确。本实验继续采用 OGD 条件培养 VSMC,并收集其培养上清液作用于正常细胞,进一步探讨 OGD 损伤细胞上清对周围正常细胞增殖和迁移的影响以及其可能的作用机制,以期对动脉粥样硬化等血管重塑类疾病的治疗及恢复提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞株与试剂 人主动脉 VSMC 购自上海生命

科学研究所生物化学与细胞生物学研究所,IL-1 及其受体拮抗剂(IL-1RA)以及基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9 ELISA 检测试剂盒购自美国 R&D 公司,总 RNA 提取试剂盒、TIAN Script cDNA 第一链合成试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,BrdU-ELISA 检测试剂盒购自麦约尔生物技术有限公司,细胞周期检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司,FAC-SCalibur 流式细胞仪购自美国 BD Biosciences 公司,抗细胞周期蛋白 D1(cyclinD1)抗体、抗 β-actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,引物委托上海生工生物工程技术有限公司合成,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养及 OGD 条件培养液的制备 将人主动脉 VSMC 接种于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的低糖 DMEM 培养液中,在 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。每 2~3 d 更换一次培养液,待细胞生长至 80%~90% 融合时进行传代。

按照本实验室已经报道的方法^[5],使用前将无血清无糖培养基通入 5% CO₂、10% H₂、85% N₂ 混合气体

[收稿日期] 2012-12-27 [接受日期] 2013-02-20

[基金项目] 辽宁省科学技术计划项目(2011225020)。Supported by the Science & Technology Project of Liaoning Province (2011225020)。

[作者简介] 孟亮,博士,副教授。

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 024-85715326, E-mail: wzxyyc@163.com

饱和 15 min,即制成无血清无糖低氧溶液。将对数生长期的 VSMC 接种于此条件溶液后置于内含 5%CO₂、10%H₂、85%N₂ 混合气体的厌氧培养箱中培养,48 h 后离心收集细胞培养上清液,即 OGD 损伤后细胞上清,称为 OGD 条件培养液,备后续实验用。

1.3 实验分组 实验设置 OGD 组(用 OGD 条件培养液培养细胞)、IL-1 组(无血清低糖的 DMEM 培养液加入 100 ng/mL 的 IL-1)、OGD+IL-1RA 组(在 OGD 组基础上加入 250 ng/mL 的 IL-1RA)以及对照组(用无血清低糖的 DMEM 培养液培养细胞)。

1.4 细胞增殖检测 采用 BrdU 标记 ELISA 法。将正常 VSMC 接种至 96 孔板,加入不同的培养液培养 48 h,加入 BrdU 标记液 10 μL,37℃ 孵育 2 h。弃去标记液,加入 FixDenat 200 μL,室温孵育 30 min。加入抗 BrdU-POD 工作液 100 μL,室温孵育 90 min,洗涤 3 次。加入底物溶液 100 μL,待产生颜色变化后加入终止液,测定其在 370 nm 处的光密度值。

1.5 细胞周期检测 正常 VSMC 加入不同的培养液培养 48 h 后收集细胞,1 300×g 离心 5 min,吸弃上清,加入预冷的 70%乙醇,于 4℃ 固定 2 h。离心弃去固定液,加入 500 μL 染色缓冲液重悬细胞。加入 25 μL 碘化丙啶染色液及 10 μL RNase A,混匀。37℃ 避光孵育 30 min,随即上流式细胞仪检测。

1.6 细胞划痕实验 将细胞接种至 6 孔板,待完全贴壁后用 20 μL 无菌枪头在细胞表面划一横线,PBS 洗涤细胞,各组加入不同的培养液,继续培养 48 h,于倒置显微镜下观察拍照。

1.7 CyclinD1 表达检测

1.7.1 RT-PCR TRIzol 法提取各组细胞的总 RNA,按照说明书方法将 mRNA 反转录成 cDNA。*CyclinD1* 的上、下游引物序列:5'-CCC GCA CGA TTT CAT TGA AC-3',5'-AGG GCG GAT TGG AAA TGA AC-3',扩增片段长度 134 bp;内参 *βactin* 的上、下游引物序列:5'-ACG TTG ACA TCC GTA AAG AC-3',5'-GAA GGT GGA CAG TGA GGC-3',扩增片段长度 200 bp。参照 2×Taq PCR MasterMix 试剂盒说明书,在 200 μL 反应管中加入 cDNA 模板 2 μL,上下游引物各 1 μL,2×Taq PCR MasterMix 10 μL,最后加入 ddH₂O 补足总体积至 20 μL。PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 20 s;60℃ 退火 20 s;72℃ 延伸 30 s,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 反应结束后于 1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳,利用 Gelpro 4.0 凝胶成像系统扫描图片并进行灰度分析。

1.7.2 蛋白质印迹分析 收集各组细胞,加入含 15 mmol/L Tris-HCl(pH 6.8)、10%丙三醇、2%SDS 和

6%β-巯基乙醇的缓冲液,超声裂解细胞。提取细胞总蛋白,行 10%SDS-PAGE。电泳结束后,将凝胶电转移至 PVDF 膜上,用含 5%脱脂奶粉的封闭液封闭 1~2 h,加入一抗(抗 cyclinD1 抗体或抗 β-actin 抗体),4℃ 孵育过夜。加入二抗室温孵育 1.5 h,将 PVDF 膜置 ECL 中反应,暗室中经 X 线片曝光,常规显影定影。用 Gene Tools 软件分析蛋白表达的灰度值。

1.8 MMP-2、MMP-9 表达水平检测 采用 ELISA 法检测各组细胞分泌 MMP-2、MMP-9 的水平,所有操作均严格按照说明书进行。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 15.0 软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 Student's *t* 检验或方差分析(ANOVA),检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 细胞增殖能力 结果(图 1)表明,OGD 组与 IL-1 组细胞增殖能力均较对照组显著增强($P < 0.01$),IL-1 组细胞增殖能力强于 OGD 组($P < 0.01$),而 OGD+IL-1RA 组细胞增殖能力显著低于 OGD 组和 IL-1 组($P < 0.01$),但与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。

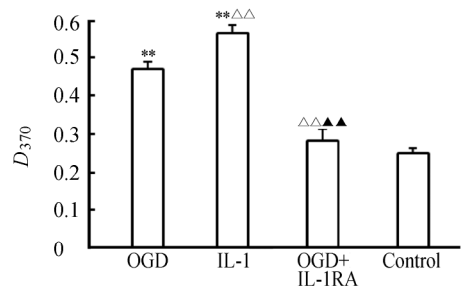


图 1 细胞增殖能力

** $P < 0.01$ 与对照组相比; △△ $P < 0.01$ 与 OGD 组相比; ▲▲ $P < 0.01$ 与 IL-1 组相比, $n=5$, $\bar{x} \pm s$

2.2 细胞周期 OGD 组和 IL-1 组 S 期细胞所占比例分别为(28.98±1.53)%和(33.86±3.14)%,均显著高于对照组的(24.24±2.10)%($P < 0.05$);IL-1RA 组 S 期所占细胞比例为(19.06±1.56)%,显著低于 OGD 组和 IL-1 组($P < 0.01$)。

2.3 细胞迁移能力 划痕实验结果见图 2,与对照组相比,OGD 组和 IL-1 组的细胞明显从划痕边缘向划痕内迁移,而 OGD+IL-1RA 组则无明显变化。

2.4 CyclinD1 的表达 OGD 组和 IL-1 组 *cyclinD1* mRNA 的表达均显著高于对照组($P < 0.05$),OGD+IL-1RA 组则显著低于 OGD 和 IL-1 组($P < 0.05$,图 3)。CyclinD1 蛋白的表达与 mRNA 基本一致(图 3)。

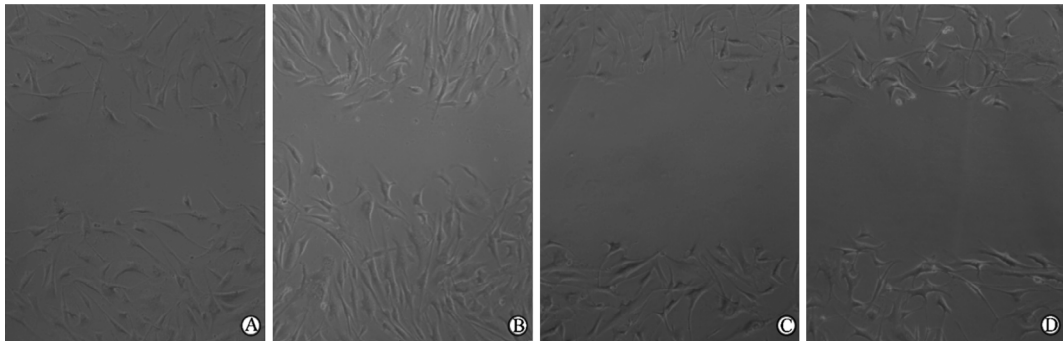


图 2 细胞迁移能力

A: OGD 组; B: IL-1 组; C: IL-1RA 组; D: 对照组. Original magnification: ×100

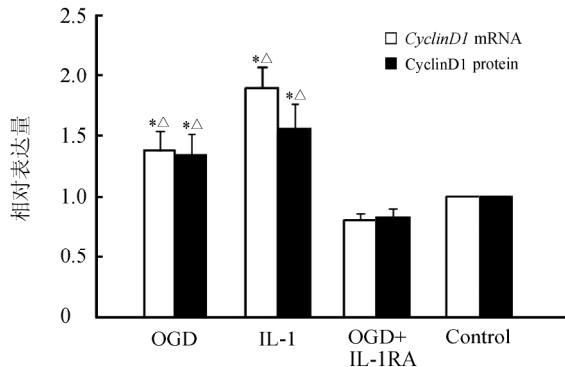
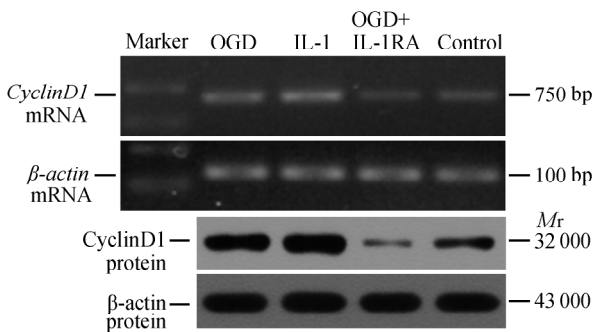


图 3 CyclinD1 的 mRNA 和蛋白表达

* $P < 0.05$ 与对照组相比; $\Delta P < 0.05$ 与 OGD+IL-1RA 组相比. $n = 3, \bar{x} \pm s$

和功能退化,包括中层平滑肌萎缩、VSMC 减少、弹性蛋白降解以及血管老化^[9],表明 VSMC 损伤可能是各类血管病变的早期事件。本研究首先采用氧糖剥夺条件培养 VSMC 模拟体内血管平滑肌细胞的受损过程,收集其细胞培养上清液作为条件培养液培养正常的 VSMC,发现培养后的正常 VSMC 增殖和迁移能力显著增强,提示受损的 VSMC 能够释放某些细胞因子并通过某些途径(如细胞间的信号传递)影响周围细胞的功能。

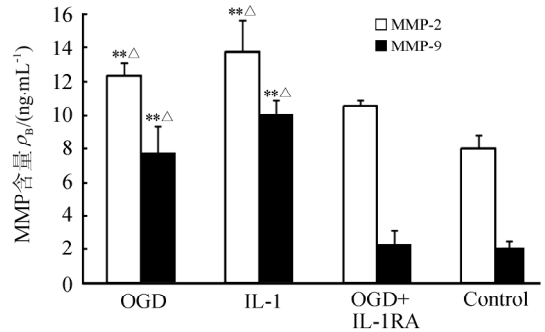


图 4 MMP-2、MMP-9 的表达

** $P < 0.01$ 与对照组相比; $\Delta P < 0.05$ 与 OGD+IL-1RA 组相比. $n = 3, \bar{x} \pm s$

2.5 MMP-2、MMP-9 的表达 ELISA 检测 MMP-2、MMP-9 表达的结果如图 4, OGD 组和 IL-1 组 MMP-2 的表达均显著高于对照组 ($P < 0.01$) 及 OGD+IL-1RA 组 ($P < 0.05$); MMP-9 的表达与 MMP-2 基本一致(图 4)。

3 讨论

在血管重塑类疾病中,尤其在血管形成术后再狭窄中,由于缺血缺氧以及血管成形术本身的机械损伤,常造成血管壁受损。VSMC 的损伤、凋亡和坏死是血管重构类疾病常见的病理过程^[6-7]。VSMC 的大幅度凋亡将加速易损斑块的形成并诱发机体的炎症反应^[8],而慢性凋亡则会促进粥样硬化的形成、血管损伤

Clarke 等^[4] 研究指出,受损的 VSMC 能够释放 IL-1,其中凋亡细胞释放 IL-1 β ,坏死细胞释放 IL-1 α ,由凋亡引发的坏死细胞则能够同时释放 IL-1 α 和 IL-1 β 。IL-1 α 和 IL-1 β 能够结合于相同的细胞表面受体,并诱导类似的生物学功能,包括细胞因子的产生、内皮细胞和巨噬细胞的激活、VSMC 的增殖、血管通透性的增加以及促进黏附分子的释放^[10],而这些过程均与动脉粥样硬化密切相关。本研究中 OGD 组和 IL-1 组细胞增殖和迁移能力均显著增强,而在 OGD 条件培养液中加入 IL-1RA 能够显著降低细胞的增殖和迁移,表明 IL-1 在受损细胞上清液引发的细胞异常增殖和迁移中发挥着关键的作用。

CyclinD1 可调控细胞周期,是细胞从 G₁ 期向 S 期过渡的重要因子^[11]。本研究中 cyclinD1 在 OGD 组和 IL-1 组表达均显著升高,在 IL-1RA 组则显著降低,与细胞周期检测结果一致。MMP 能够降解细胞外基质,将 VSMC 从基底膜中释放出来,促进其增殖和迁移^[12]。MMP-2 和 MMP-9 是血管壁细胞表达和分泌的最主要的 MMP,本研究中 MMP-2、MMP-9 在 OGD 组和 IL-1 组表达升高,而在 OGD+IL-1RA 组表达下降,与细胞划痕实验结果一致。研究表明 *cyclinD1* 和 *MMP* 的启动子区都含有 NF- κ B 的结合位点,能够被 NF- κ B 激活而表达升高^[13-14],IL-1 能够诱导 NF- κ B 抑制物 I κ B 的磷酸化而激活 NF- κ B^[15],据此推测,损伤的 VSMC 大量释放 IL-1,周围正常细胞的表面受体接受刺激信号后激活 NF- κ B,NF- κ B 将信号传递入核后诱发了周围细胞的增殖和迁移。

动脉粥样硬化已被公认是一种复杂的慢性炎症反应。最新研究指出,坏死 VSMC 释放的 IL-1 α 还能够通过与细胞内受体的结合促进正常细胞 IL-6、MCP-1 等炎症因子的表达,诱导炎症反应^[16]。所以,VSMC 损伤及其释放的 IL-1 在动脉粥样硬化等血管重塑类疾病中发挥着不可忽视的作用,而对细胞内信号传递系统进行深入探讨将为动脉粥样硬化等血管重构疾病的预防及治疗提供崭新的思路。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Allard D, Figg N, Bennett M R, Littlewood T D. Akt regulates the survival of vascular smooth muscle cells via inhibition of FoxO3a and GSK3[J]. J Biol Chem, 2008,283:19739-19747.
- [2] Meng D, Lv D D, Fang J. Insulin-like growth factor- I induces reactive oxygen species production and cell migration through Nox4 and Rac1 in vascular smooth muscle cells[J]. Cardiovasc Res, 2008, 80: 299-308.
- [3] Yu H, Clarke M C, Figg N, Littlewood T D, Bennett M R. Smooth muscle cell apoptosis promotes vessel remodeling and repair via activation of cell migration, proliferation, and collagen synthesis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31: 2402-2409.
- [4] Clarke M C, Talib S, Figg N L, Bennett M R. Vascular smooth muscle cell apoptosis induces interleukin-1 directed inflammation: effects of hyperlipidemia-mediated inhibition of phagocytosis[J]. Circ Res, 2010, 106: 363-372.
- [5] Meng L, Yu B. Oxygen- and glucose-deprived culture promotes cell proliferation and invasion of vascular smooth muscle cells[J]. Int J Mol Med, 2011, 28: 777-783.
- [6] Kavurma M M, Bhindi R, Lowe H C, Chesterman C, Khachiqian L M. Vessel wall apoptosis and atherosclerotic plaque instability[J]. J Thromb Haemost, 2005, 3: 465-472.
- [7] Bennett M, Yu H, Clarke M. Signalling from dead cells drives inflammation and vessel remodelling[J]. Vascul Pharmacol, 2012, 56: 187-192.
- [8] Clarke M C, Figg N, Maguire J J, Davenoport A P, Goddard M, Littlewood T D, et al. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis[J]. Nat Med, 2006, 12: 1075-1080.
- [9] Sawabe M. Vascular aging: from molecular mechanism to clinical significance[J]. Geriatr Gerontol Int, 2010, 10 (Suppl 1): S213-S220.
- [10] Fearon W F, Fearon D T. Inflammation and cardiovascular disease: role of the interleukin-1 receptor antagonist[J]. Circulation, 2008, 117: 2577-2579.
- [11] Ferrer J L, Dupuy J, Borel F, Jacquamet L, Noel J P, Dulic V. Structural basis for the modulation of CDK-dependent/independent activity of cyclin D1[J]. Cell Cycle, 2006, 5: 2760-2768.
- [12] Newby A C, Zaltsman A B. Molecular mechanisms in intimal hyperplasia[J]. J Pathol, 2000, 190: 300-309.
- [13] Joyce D A, Bouzahzah B, Fu M, Albanese C, D'Amico M, Steer J, et al. Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor- κ B-dependent pathway[J]. J Biol Chem, 1999, 274: 25245-25249.
- [14] Nakashima H, Aoki M, Miyake T, Kawasaki T, Iwai M, Jo N, et al. Inhibition of experimental abdominal aortic aneurysm in the rat by use of decoy oligodeoxynucleotides suppressing activity of nuclear factor kappaB and ets transcription factors[J]. Circulation, 2004, 109: 132-138.
- [15] Sasu S, Beasley D. Essential roles of IkappaB kinases alpha and beta in serum-and IL-1-induced human VSMC proliferation[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 278: 1823-1831.
- [16] Zheng Y, Humphry M, Maguire J J, Bennett M R, Clarke M C. Intracellular interleukin-1 receptor 2 binding prevents cleavage and activity of interleukin-1 α , controlling necrosis-induced sterile inflammation [J]. Immunity, 2013, 38: 285-295.