

瘦素对大鼠主动脉平滑肌细胞迁移和增殖的影响

王丽, 唐澜, 赵勇, 黄芬, 王华兵, 王洪杰, 曾和松

(华中科技大学同济医学院附属同济医院心内科, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 病理学与病理生理学; 瘦素; 平滑肌细胞; 迁移; 增殖; 动脉粥样硬化; 大鼠

[摘要] 目的 探讨瘦素对大鼠主动脉平滑肌细胞迁移和增殖的影响, 以阐明瘦素在动脉粥样硬化发生发展机制中的作用。方法 体外培养大鼠主动脉平滑肌细胞至第 4~6 代, 分别用不同浓度的瘦素 (0、20、40、80、100、200 $\mu\text{g/L}$) 孵育 24 h 后: 模拟 Boyden 实验, 检测瘦素对平滑肌细胞趋化迁移的影响; MTT 法检测瘦素对平滑肌细胞生长的影响; 流式细胞仪检测瘦素对平滑肌细胞增殖指数的影响。结果 瘦素对平滑肌细胞的生长有促进作用, 这种促增殖效应呈剂量依赖性, 在瘦素浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 时达最大效应 (OD 值为 0.193 ± 0.010)。瘦素对平滑肌细胞增殖指数的影响与此相同。瘦素有明显的促进平滑肌细胞趋化迁移作用, 而且随着瘦素浓度的增加, 迁移的细胞数目明显增多。结论 瘦素可以促进平滑肌细胞的迁移和增殖, 提示瘦素可能有促进动脉粥样硬化的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effects of Leptin on the Migration and Proliferation in Vascular Smooth Muscle Cell

WANG Li, TANG Lan, ZHAO Yong, HUANG Fen, WANG Hua Bing, WANG Hong Jie, and ZENG He Song

(Department of Cardiology, Tongji Affiliated Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China)

[KEY WORDS] Leptin; Vascular Smooth Muscle Cell; Migration; Proliferation; Atherosclerosis; Rats

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of leptin on the migration and proliferation of vascular smooth muscle cell (VSMC) in vitro. **Methods** The smooth muscle cells at passage of 4~6 were incubated with leptin in different concentrations (0, 20, 40, 80, 100, 200 $\mu\text{g/L}$) for 24 hours, then modified Boyden's experiment was used to measure the effect of leptin on migration; MTT was used to measure the dosage effect curve of leptin on the growth of VSMC; and flow cytometry (FCM) was used to measure the effect of leptin on the cell cyclin. **Results** The growth of VSMC was promoted with the concentration of leptin, and reached the maximum (OD: 0.193 ± 0.010) at 100 $\mu\text{g/L}$, so did the effect of leptin on the proliferation index of VSMC. Leptin can promote the migration of VSMC, and the number of migrated cell was promoted with the increase of leptin concentration. **Conclusion** Leptin can promote the migration and proliferation of VSMC in vitro, which explicits the effects of leptin in the atherosclerosis.

瘦素(leptin)是肥胖基因编码合成、由脂肪组织分泌的一种含 167 个氨基酸的多肽激素^[1]。瘦素不仅参与机体糖、脂肪代谢及体重的调节, 还与高血压、某些肿瘤的发生、免疫功能的调节有一定的关系, 是近年研究较多的脂肪因子。近来国外的研究显示瘦素可能在动脉粥样硬化形成中起一定作用。众所周知, 血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的迁移和增殖在动脉粥样硬化斑块形成及血管成形术后再狭窄的发生过程中起重要作用。因此本研究采用体外培养的 VSMC, 观察瘦素对 VSMC 迁移和增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

实验大鼠由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。瘦素干粉剂、胶原酶 iv、四甲基氮唑盐(MTT)、DMSO(二甲基亚砷)(Sigma, USA); DMEM 培养基(高糖)、胰蛋白酶、碘化丙啶、RNaseA (Gibco, USA); 96 孔培养板、Transwell 培养板 (Corning, USA); 胎牛血清(fetal calf serum, FCS) (Hyclone, USA); 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)。

1.2 血管平滑肌细胞的原代培养^[2]

180~200 g 雄性 SD 大鼠, 脱臼处死后浸泡在 75% 酒精中消毒片刻, 严格无菌条件下, 迅速取出胸主动脉, 放入 D-Hanks 液中冲洗。用镊子去除血管周围结缔组织, 然后弯头镊刮除血管内膜, 剥离出中膜, 在青霉素小瓶中剪碎(约 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$), 加入 0.25% 胶原酶 iv, 置入 37°C 摇床中, 消化过夜。将消化好的组织块 $1\,000 \text{ r/min}$ 离心 10 min, 倒去上清

[收稿日期] 2006-02-20 [修回日期] 2006-10-26

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30470713)

[作者简介] 王丽, 硕士研究生。唐澜, 硕士研究生。通讯作者曾和松, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病防治的研究, E-mail 为 Zenghs@tjh.tjmu.edu.cn。

液,加入 20% FCS 的 DMEM 培养基,吹打混匀后,转入培养瓶中,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中静置培养,每 3 天换液一次。选用 4~6 代的细胞,平滑肌细胞通过形态学及 α -SM-actin 免疫组织化学方法鉴定。

1.3 实验分组

待细胞生长至 80% 汇合时,将细胞分为不同浓度瘦素处理组(20, 40, 80, 100, 200 μ g/L)及空白对照组,瘦素孵育 24 h 后检测相关指标。检测细胞周期时,加瘦素处理前先用 0.2% FCS 的培养基培养 48 h 使其同步化。每组设复孔三个,重复实验三次。

1.4 平滑肌细胞趋化迁移测定

模拟 Boyden 实验^[3],取生长活跃的 VSMC(第 4~6 代)进行实验。将 Transwell 培养板的 PVDF 滤膜(孔径为 8 μ m)先经 0.01% 明胶于室温中包被 24 h,自然干燥后使用。0.25% 胰蛋白酶消化 VSMC,用含 0.2% FCS 的 DMEM 培养基将细胞洗涤后密度调整为 1×10^8 个/L,使细胞在培养液中悬浮 1 h 以恢复形态。混匀细胞悬液,吸取 0.1 mL 分别加入 Transwell 培养板的上室,吸取含瘦素及 1% FCS 的 DMEM 培养基(瘦素浓度分别为 0, 40, 80, 100 μ g/L) 0.6 mL 加入 Transwell 培养板的下室。封闭下室小孔,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中静置 6 h。用手术刀片切下 PVDF 滤膜,D-Hanks 液洗 2 次,用棉签擦去滤膜上室面的平滑肌细胞,无水乙醇固定 10 min,以杀死细胞,苏木素中染色 10 min,蒸馏水冲洗。将滤膜上载玻片(下室面朝上)以中性树胶封片,在显微镜下随机计数 5 个视野中的细胞数,试验重复 3 次。

1.5 瘦素对平滑肌细胞增殖的量效曲线测定^[4]

取 96 孔细胞培养板,每孔中加入 0.1 mL 含靶细胞的培养液(10% FCS 的 DMEM 培养基),在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后换含有瘦素的培养基,使其终浓度分别是 0、20、40、80、100 和 200 μ g/L,每种浓度设 3 个平行孔,设立无细胞组为实验对照组。孵育 24 h 后弃去培养基,D-Hanks 液洗涤一次,每孔加入 0.1 mL D-Hanks 液和 10 μ L MTT 染液,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 4 h。弃去所有上清,每孔加 0.1 mL DMSO,在振荡器上震荡混匀,让还原产物(formazan 紫色结晶)充分溶解。置酶联检测仪上测定各孔于 490 nm 处光密度(OD)值。

1.6 平滑肌细胞周期的测定

平滑肌细胞接种于培养瓶 24 h 后,弃去原有培养液,D-Hanks 液洗 3 遍,加入含 0.2% FCS 的培养基培养 48 h 使其同步化后,改用含有瘦素的培养基培养(终浓度分别是 0、20、40、80、100 和 200 μ g/L) 24 h。然后将细胞消化下来,离心收集细胞后,用 75% 冷

乙醇固定,-20℃冰箱中放置 24 h 后离心,D-Hanks 液洗 2 遍,加含 RNaseA 的 PI 染色液 1 mL,室温避光染色 30 min 后上样,流式细胞仪检测(激发波长为 488 nm)。

1.7 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 不同浓度瘦素对平滑肌细胞增殖量效曲线的影响

从量效曲线图(图 1)上可以看出,不同浓度的瘦素均对平滑肌细胞增殖有促进作用。瘦素各浓度(20、40、80、100 和 200 μ g/L)处理组 OD 值(分别为 0.161 ± 0.010 、 0.166 ± 0.020 、 0.171 ± 0.010 、 0.193 ± 0.010 、 0.192 ± 0.020)与空白对照组(0.143 ± 0.020)之间差异均有显著性($P < 0.01$),200 μ g/L 处理组与 100 μ g/L 处理组间差异无显著性($P > 0.05$)。可见,瘦素对 VSMC 的促增殖效应呈剂量依赖性,在瘦素浓度为 100 μ g/L 时达最大效应。

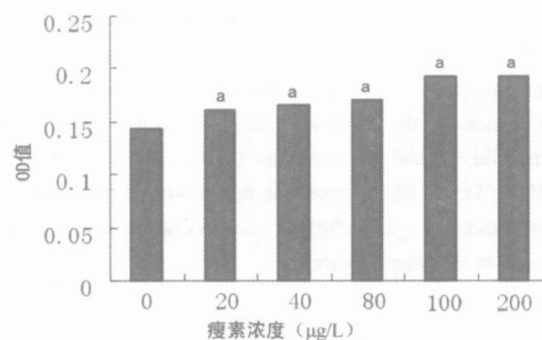


图 1. 瘦素对血管平滑肌细胞增殖的量效关系图 a 为 $P < 0.05$, 与 0 μ g/L 瘦素处理组比较。

2.2 瘦素对平滑肌细胞细胞周期的影响

不同浓度的瘦素对平滑肌细胞周期均有促进作用(表 1)。瘦素各浓度(20、40、80、100 和 200 μ g/L)处理组增殖指数(proliferation index, PI)与空白对照组之间差异均有显著性($P < 0.05$),且 PI 值随瘦素浓度升高而增大($P < 0.05$),200 μ g/L 处理组与 100 μ g/L 处理组之间差异无显著性($P > 0.05$)。由此可见,瘦素对 VSMC 细胞周期的影响呈剂量依赖性,在瘦素浓度为 100 μ g/L 时达最大效应。

2.3 瘦素对平滑肌细胞趋化迁移的影响

瘦素各浓度处理组迁移细胞数与空白对照组比较差异均有显著性($P < 0.01$),且迁移的细胞数随瘦素浓度升高而增加($P < 0.01$, 表 2)。

表 1. 瘦素对血管平滑肌细胞周期的影响

瘦素浓度	G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M	PI
0 μg/L	63.0% ±2.4%	17.8% ±0.2%	19.0% ±0.2%	36.8% ±3.5%
20 μg/L	60.9% ±2.0%	15.2% ±0.2%	23.9% ±0.2%	39.1% ±2.8% ^a
40 μg/L	58.2% ±1.7%	14.5% ±0.1%	27.3% ±0.2%	41.8% ±3.1% ^a
80 μg/L	56.8% ±1.4%	19.3% ±0.2%	23.9% ±0.2%	43.2% ±4.7% ^a
100 μg/L	54.6% ±1.3%	22.3% ±0.2%	23.1% ±0.2%	45.4% ±3.9% ^a
200 μg/L	54.6% ±1.3%	21.0% ±0.2%	24.5% ±0.2%	45.4% ±4.1% ^a

a 为 $P < 0.05$, 与 0 μg/L 瘦素处理组比较。

表 2. 瘦素对平滑肌细胞趋化迁移的影响

瘦素浓度 (μg/L)	迁移细胞数 (个/视野)
0	11.2 ±1.5
40	15.1 ±1.1 ^a
80	25.4 ±2.7 ^{ab}
100	30.2 ±1.9 ^{abc}

a 为 $P < 0.01$, 与 0 μg/L 瘦素处理组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 40 μg/L 瘦素处理组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 80 μg/L 瘦素处理组比较。

3 讨论

血管平滑肌细胞(VSMC)的迁移和增殖在动脉粥样硬化斑块形成及血管成形术后再狭窄的发生过程中起着重要的作用。一般情况下,机体内血管中膜的 VSMC 处于静息状态,不会发生迁移。当血管损伤时,首先是血管中膜的 VSMC 发生表型转换,由合成型转变成收缩型,相对稳定的细胞开始增生,然后增殖的 VSMC 由中膜迁移到内膜,结果使内膜中 VSMC 大量积聚和结缔组织形成,进而促进新生内膜形成和动脉粥样硬化^[5]。本研究结果表明不同浓度的瘦素均有促进平滑肌细胞趋化迁移的作用,且均对平滑肌细胞生长和细胞周期有促进作用。瘦素对 VSMC 的促增殖效应及细胞周期的影响均呈剂量依赖性,在瘦素浓度为 100 μg/L 时达最大效应。

冠状动脉粥样硬化性心脏病是心血管疾病的主要死亡原因,发病率逐年增加。随着研究的深入,新的冠状动脉粥样硬化促进因子不断被发现。近来国外研究显示瘦素可能在动脉粥样硬化形成中起一定作用;如肥胖患者血清瘦素水平明显高于正常, Bodary 等^[6]发现瘦素可促进血管损伤后血小板聚集和动脉内血栓形成, Beltowski 等^[7]发现瘦素能抑制抗氧化酶 PON1 的活性。以上研究提示瘦素可能与动脉粥样硬化的形成有一定关系。苏格兰格拉斯哥大学 Sattar 领导的为期 5 年的大规模冠心病防治的前瞻性研究对 1 740 人的研究表明,瘦素独立

于年龄、体质指数、血压和血脂,成为预示冠心病发病的危险因素^[8]。

瘦素发挥其生物学作用是通过与瘦素受体结合而实现的。瘦素受体属于 iv 类细胞因子受体家族,其信号转导通路也与其它细胞因子受体信号通路相似。瘦素受体主要通过 Janus 激酶(Janus kinase, JAK)转录子的单转导体和活化体(signal transducer and activator of transcription, STAT)通路调控靶基因的转录,也可通过分裂素活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)和磷酸肌醇 3 激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)通路传递信号^[9]。有资料报道,VSMC 迁移和增殖的信号转导通路是 PI3K 通路、MAPK 通路和 JAK- MAPK 通路^[10]。因此不难推测,瘦素促进平滑肌细胞的迁移和增殖可能是通过 PI3K 通路、MAPK 通路和 JAK- MAPK 通路。

我们的研究表明,在体外瘦素可以促进平滑肌细胞迁移和增殖,虽然已经明确瘦素是冠心病发病的危险因素,但具体作用机制目前尚不清楚,有待进一步深入研究,从而为冠心病的防治提供理论依据。

[参考文献]

- [1] Mario Baratta. Leptin: from a signal of adiposity to a hormonal mediator in peripheral tissues [J]. *Med Sci Monit*, 2002, **8** (12): RA282-292
- [2] Stephen Gunther, Wayne Alexander R, Atkinson William J, Gimbrone Michael A. Functional angiotensin II receptors in cultured vascular smooth muscle cells [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1982, **92**: 289-298
- [3] Stephan Goetze, Anne Bungenstock, Cornelia Czupalla, Friedrich Eilers, Philipp Stawowy, Ulrich Kintscher, et al. Leptin induces endothelial cell migration through Akt, which is inhibited by PPAR γ ligands [J]. *Hypertension*, 2002, **40**: 748-754
- [4] Katrin Schafer, Martin Halle, Colin Goeschen, Claudia Dellas, Marianne Pynn, David J. Leptin promotes vascular remodeling and neointimal growth in mice [J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2004, **24** (1): 112-117
- [5] 韩英,谢良地. 血管平滑肌细胞迁移的调控机制[J]. *高血压杂志*, 2003, **11** (2): 98-101
- [6] Bodary PF, Westrick RJ, Wickenheiser KJ, Shen Y, Eitzman DT. Effect of leptin on arterial thrombosis following vascular injury in mice [J]. *JAMA*, 2002, **287**: 1 706-709
- [7] Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz A. Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induces oxidative stress: the possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia [J]. *Atherosclerosis*, 2003, **170** (1): 21-29
- [8] Wallace Am, Mc Mahon AD, Packard CJ. Plasma leptin and the risk of cardiovascular disease in the west of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS) [J]. *Circulation*, 2001, **104** (25): 3 052-056
- [9] Christian Bjorbak, Shigeo Uotani, Barbara da Silva, Flier Jeffrey S. Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor [J]. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 32 686-695
- [10] Nico Ghilardi, Radek C, Skoda. The leptin receptor activates janus kinase2 and signals for proliferation in a factor-dependent cell line [J]. *Molecular Endocrinology*, 1997, **11** (4): 393-399

(此文编辑 许雪梅)