

高糖对大鼠血管平滑肌细胞迁移的影响及其机制

楚海荣, 李 宏, 吴海燕, 苏绍娟, 张 静, 刘建华, 成 敏

(潍坊医学院医学研究中心, 山东省潍坊市 261053)

[关键词] 高糖; 血管平滑肌细胞; 表型转化; 细胞迁移

[摘 要] **目的** 探讨高糖对大鼠血管平滑肌细胞(VSMC)迁移的影响及机制。**方法** 利用组织块贴壁法培养大鼠主动脉 VSMC, 以 3~5 代细胞为靶细胞, 待细胞融合后用 2% 胎牛血清的 DMEM 同步化 12 h, 再经含低糖(5.5 mmol/L 葡萄糖)、高糖(25 mmol/L 葡萄糖)及甘露醇(5.5 mmol/L 葡萄糖 + 19.5 mmol/L 甘露醇)的 DMEM 处理 24 h。以改良 Boyden 小室观察 VSMC 迁移能力的变化, 细胞免疫荧光分析骨架蛋白 F-actin 的改变, 荧光定量 RT-PCR 分析收缩型平滑肌标志基因 α -SMA 和合成型平滑肌标志基因骨桥蛋白(OPN)以及基质金属蛋白酶 2(MMP-2)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)基因的表达情况。**结果** 高糖促进 VSMC 迁移。在高糖环境下, VSMC 由收缩型向合成型转变, 即 α -SMA 的表达量明显下降, 而 OPN 的表达量明显升高; 高糖促进 MMP-2、MMP-9 的基因表达(分别为低糖组的 3.12 倍和 2.22 倍), 使 F-actin 的排列发生明显改变。**结论** 高糖促进 VSMC 迁移, 其可能的机制涉及 VSMC 的表型转变、基质金属蛋白酶表达及 F-actin 排列的改变。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of High Glucose on the Migration of Vascular Smooth Muscle Cells and Its Mechanisms

CHU Hai-Rong, LI Hong, WU Hai-Yan, SU Shao-Juan, ZHANG Jing, LIU Jian-Hua, and CHENG Min

(Medicine Research Center, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, China)

[KEY WORDS] High Glucose; Vascular Smooth Muscle Cells; Phenotype Transformation; Migration

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects and mechanisms of high glucose on the migration of vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** VSMC were isolated from rat arteriae aorta. The 3rd~5th VSMC were incubated with low glucose (5.5 mmol/L), high glucose (25 mmol/L) or mannitol (5.5 mmol/L glucose + 19.5 mmol/L mannitol). After 24 h, VSMC migration was assayed with modified Boyden chamber. The effects of high glucose on F-actin cytoskeleton were analysed by immunofluorescence technique. The gene expression of α -SMA, osteopontin (OPN), MMP-2 and MMP-9 was determined by real time RT-PCR. **Results** The migration of VSMC was obviously increased when the cells were cultured with high glucose. Compared with the low glucose group, mRNA levels of MMP-2 and MMP-9 increased obviously in the high glucose group. Moreover, high glucose induced VSMC conversion from contractile phenotype to synthetic phenotype and led to the reorganization of cytoskeleton. **Conclusion** High glucose promotes the migration of VSMC via complex mechanisms, involved in regulating VSMC phenotype transformation, increasing MMP expression and reorganizing cytoskeleton.

糖尿病是一种慢性代谢障碍性疾病, 发病率在世界范围内逐年增加, 其心脑血管并发症是糖尿病患者致残、致死的主要原因。最新研究认为, 除内皮细胞

以外, 血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)功能受损也是 2 型糖尿病血管功能障碍的一个重要原因^[1], 微循环中 VSMC 功能恶化可能是 2 型

[收稿日期] 2014-03-24

[基金项目] 山东省自然科学基金项目(ZR2013CQ032); 山东省高等学校科技计划项目(J11LF17); 山东省中医药科技发展计划项目(2013-239); 潍坊市科技发展计划项目(20121228)

[作者简介] 楚海荣, 硕士, 实验师, 研究方向为动脉粥样硬化发病的基础与临床, E-mail 为 chr7968@163.com。李宏, 硕士, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制及防治。通讯作者成敏, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为细胞生物力学, E-mail 为 chengmin1976@wfmc.edu.cn。

糖尿病独有的特征。已有研究表明,作为糖尿病性心脑血管并发症的独立危险因素——高血糖可诱导 VSMC 的增殖和凋亡^[2]。但 VSMC 由血管中膜向内膜下迁移是动脉粥样硬化新生内膜形成的另一重要病理过程^[3]。鉴于目前关于高糖对 VSMC 迁移能力的影响及有关机制的报道甚少,本研究旨在探讨高糖对 VSMC 迁移能力的影响并研究其可能机制,为糖尿病血管并发症的防治提供一定的理论及实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

DMEM(低糖型和高糖型)培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购自 Hyclone 公司;改良 Boyden 小室(江苏海门麒麟仪器厂); α 平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)单克隆抗体(北京中杉金桥);Trizol(Invitrogen 公司);荧光定量 RT-PCR 相关试剂(大连宝生物工程有限公司)。

1.2 大鼠胸主动脉 VSMC 的分离、培养及鉴定

参照文献[4],将无菌分离的大鼠胸主动脉纵向剪开血管腔,剪成约 0.2~0.5 cm³ 小块,按 3~5 块/cm² 密度种植入 10 mL 培养瓶。粘有植块的瓶底朝上,含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基在下方。放置 4~6 h 后翻转培养瓶,使植块浸入培养基中。待植块周围生长出的细胞融合成片,常规消化传代。将培养的细胞在倒置显微镜下观察并拍照,并用特异性 α -SMA 单克隆抗体免疫荧光进行鉴定。

1.3 实验分组

取处于对数生长期 3~5 代的 VSMC 按 2×10^8 Cells/L 的密度接种至 12 孔板,待细胞融合至 90% 时,2% 胎牛血清的 DMEM 同步化 12 h 后,分组:①低糖组(5.5 mmol/L 葡萄糖);②高糖组(25 mmol/L 葡萄糖);③甘露醇组(5.5 mmol/L 葡萄糖 + 19.5 mmol/L 甘露醇)。

1.4 Boyden 小室检测 VSMC 体外迁移能力

用 0.25% 胰蛋白酶消化收集各组细胞,重悬于 500 μ L 培养液中,计数。将 8 μ m 滤膜放入 Boyden 小室中间,上室注入 50 μ L 不同处理组的 VSMC (5×10^8 Cells/L),置 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养。8 h 后用湿棉签轻轻刮去滤膜上面未移动细胞,4% 多聚甲醛固定,DAPI 染色,随机选择 5 个显微镜视野计数迁移至下层的细胞。

1.5 细胞免疫荧光检测细胞骨架蛋白 F-actin 的变化

VSMC 用预温的 PBS 洗涤后,4% 多聚甲醛固定

10 min, PBS 洗 5 min \times 3 次, FITC-Phalloidin (5 mg/L) 37℃ 染色 30 min, PBS 洗 5 min \times 3 次后,荧光封片剂封片,倒置荧光显微镜观察拍照。

1.6 荧光定量 RT-PCR 检测 α -SMA、骨桥蛋白、基质金属蛋白酶 2 和 9 基因的表达

采用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,溶于 DEPC 处理的去离子水中, -70℃ 保存备用。SYBR Green 荧光定量 RT-PCR 测定各组 α -SMA、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP) 2 和 9 基因的表达,相关基因引物序列如表 1 所示。实验中以管家基因 GAPDH 作为内参,以超纯水(PCR 级,无 RNase)作为阴性对照。按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算出各组扩增效率。

表 1. 相关基因的引物序列
Table 1. Sequences for primers

基因	引物序列
α -SMA	上游引物 5'-AGCCAGTCGCCATCAGGAAC-3'
	下游引物 5'-CCGGAGCCATTGTCACACAC-3'
OPN	上游引物 5'-GCATCCTTGGCTTTGCAGTC-3'
	下游引物 5'-TGGCTACAGCATCTGAGTGTG-3'
MMP-2	上游引物 5'-TCCCAGATCTGCAAGCAAG-3'
	下游引物 5'-AGAATGTGGCCACCAGCAAG-3'
MMP-9	上游引物 5'-AGCCGGGAACGTATCTGGA-3'
	下游引物 5'-TGAAACTCACACGCCAGAAG-3'
GAPDH	上游引物 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'
	下游引物 5'-ATGCTGTTGAAGACGCCAGTA-3'

1.7 统计学方法

所有实验均重复 3~4 次。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 ANOVA 分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 VSMC 的鉴定

原代培养 4~7 天,大部分组织块周围有细胞从组织块边缘游出,细胞向外生长形成细胞晕,进而形成细胞簇。细胞有长梭形、三角形或不规则形等形态,折光性强,有长短不一的胞突。传代细胞呈典型的“峰-谷”状生长。细胞免疫荧光鉴定结果显示表达平滑肌细胞特异性的 α -SMA,证实为 VSMC(图 1)。

2.2 高糖对 VSMC 迁移的影响

低糖组 VSMC 迁移数较少,高糖处理明显增加了 VSMC 迁移数(368.0 ± 13.6 比 253.7 ± 16.5 , $P < 0.05$),而甘露醇组对 VSMC 迁移数没有明显影响(图 2)。

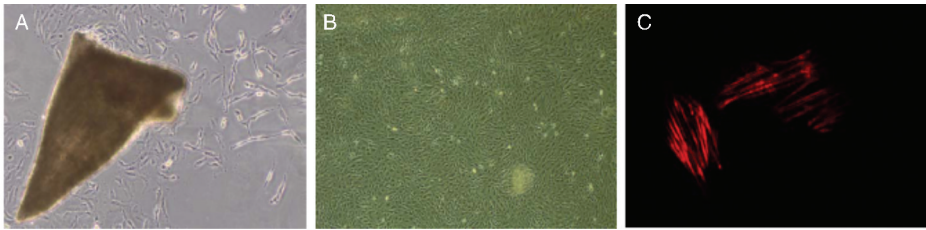


图 1. VSMC 形态及鉴定结果 A 为培养 7 天的细胞(200 ×),B 为 VSMC 经典的“峰-谷”形态(100 ×),C 为 α-SMA 免疫荧光阳性鉴定(400 ×)

Figure 1. VSMC morphology and identification

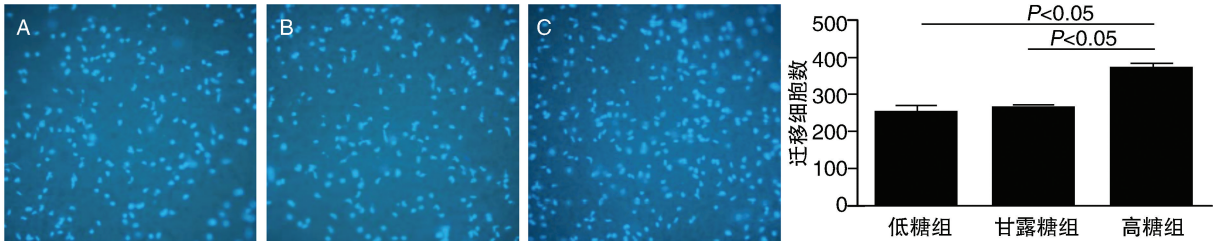


图 2. 高糖对 VSMC 迁移的影响(×200, n = 3) A 为低糖组,B 为甘露醇组,C 为高糖组。a 为 $P < 0.05$

Figure 2. Effect of high glucose on the migration of VSMC

2.3 高糖对 VSMC 表型转化的影响

在高糖刺激下,VSMC 收缩型标志蛋白 α-SMA 的表达量下降,而合成型标志蛋白 OPN 的表达量则明显升高,提示高糖促进了 VSMC 的表型转化,VSMC 由收缩型转变为合成型(图 3)。

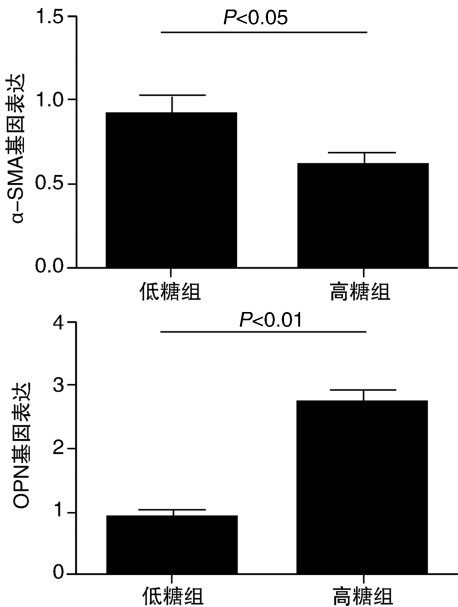


图 3. 高糖对 VSMC 表型转化的影响($n = 5$)

Figure 3. High glucose promotes the phenotype transformation of VSMC

2.4 高糖对细胞骨架蛋白 F-actin 的影响

在低糖环境下,细胞骨架蛋白成份 F-actin 主要

分布在细胞周边,排列松散且肌丝细小,仅有少量短而细的应力纤维,无丝状伪足形成(图 4A);而在高糖环境下,细胞发生伸展,F-actin 肌丝明显变粗,应力纤维增多,荧光强度增强,可见伪足形成(图 4B)。

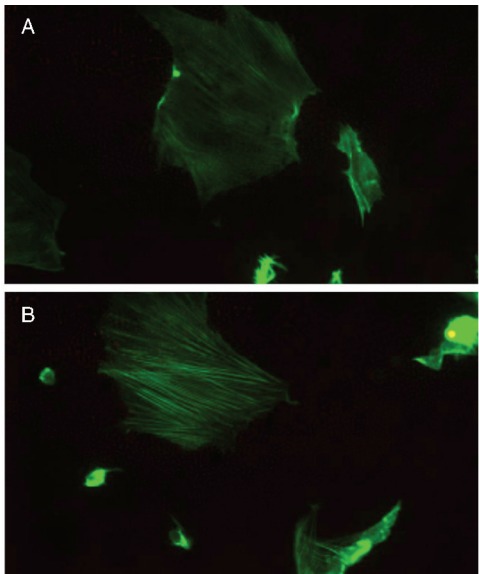


图 4. 高糖对 VSMC 细胞骨架蛋白 F-actin 的影响 A 为低糖组,B 为高糖组。

Figure 4. Effects of high glucose on the F-actin of VSMC

2.5 高糖对 MMP-2 和 MMP-9 基因表达的影响

与低糖组相比,高糖组显著上调 VSMC MMP-2 和 MMP-9 基因的表达,其表达量分别为低糖组的 3.12 ± 0.14 倍和 2.22 ± 0.26 倍(图 5)。

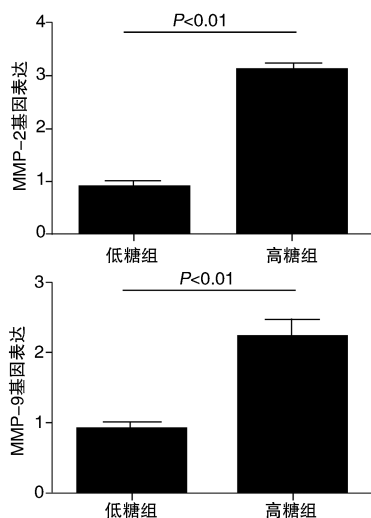


图 5. 高糖对 VSMC MMP-2 和 MMP-9 的影响

Figure 5. Effects of high glucose on the expression of MMP-2, and MMP-9

3 讨论

研究表明,糖尿病患者多并发动脉粥样硬化性血管损伤性病变。而 VSMC 从血管中膜向内膜下迁移是这些病理改变中最具特征性的细胞学事件^[3]。正常情况下,VSMC 没有迁移的特性,但当 VSMC 表型发生转化即由收缩型转化为合成型,则可迁移至血管内膜并向周围分泌大量胶原基质,进而促进新生内膜形成^[5]。本研究证实,在高糖环境下,VSMC 的迁移能力明显升高;与之对应的则是高糖能够诱导 VSMC 发生表型转化,具体表现为其收缩型标志蛋白 α -SMA 的表达明显下降,而合成型标志蛋白 OPN 的表达明显升高,这和揭伟等^[6]的研究结果一致。这种表型的转化,使 VSMC 具备了迁移和合成能力,这极可能是导致糖尿病患者动脉弹性减退和血管硬化的重要原因。

另外,细胞迁移与细胞骨架 F-actin 的结构变化有关,F-actin 除提供维持细胞形状和细胞极性所需的结构网架外,其具有的动力学特征尚可提供细胞移动所需的趋动力。高凌云等^[7]研究表明,F-actin 的表达可促进 VSMC 迁移。本研究中,在低糖环境下,细胞骨架蛋白 F-actin 主要分布在细胞周边,排列松散且肌丝细小,仅有少量短而细的应力纤维,无丝状伪足形成;而在高糖环境下,F-actin 肌丝明显变粗,应力纤维增多,荧光强度增强,可见伪足形成。该结果提示高糖介导的促 VSMC 迁移作用可能是通过促进细胞骨架蛋白 F-actin 的组装来完成的。

VSMC 通常由致密的细胞外基质包围,因此中膜 VSMC 的迁移除与细胞本身有关外,还须突破细胞周围的迁移屏障即成分复杂的细胞外基质。研

究发现 MMP 是一类对细胞外基质具有降解活性的蛋白酶超家族,它通过改变细胞-基质结合特性来协助 VSMC 的迁移,因而在新生内膜的形成中发挥重要的促进作用^[8]。MMP-2 是 VSMC 表达和分泌的最主要的 MMP,具有强烈的胶原酶与明胶酶活性,是 VSMC 在穿过内弹力板、基底膜等屏障过程中的一种必需物质^[9]。MMP-9 又称明胶酶 B,可以高效降解 IV 型胶原^[10],引起血管内膜增厚,导致管腔狭窄。本研究结果发现,高糖能明显刺激 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 的表达升高,这和路艳等^[11]的研究结果一致,提示高糖通过促进 VSMC MMP-2 和 MMP-9 的表达促进其迁移能力。

总之,本研究结果表明,高糖可通过诱导 VSMC 发生表型转化,上调 MMP-2 和 MMP-9 的表达,增强其降解基底膜的能力,以及改变细胞骨架蛋白 F-actin 的形态等机制促进 VSMC 迁移。

[参考文献]

- [1] Montero D, Walther G, Perez-Martin A, et al. Vascular smooth muscle function in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis[J]. *Diabetologia*, 2013, 56 (10): 2122-1233.
- [2] 冯朝彩, 赵占胜, 李丹, 等. 波动性高糖对血管平滑肌细胞增殖及凋亡蛋白表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011 (11): 897-900.
- [3] Zargham R. Preventing restenosis after angioplasty: a multistage approach[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2008, 114(4): 257-264.
- [4] 吴海燕, 楚海荣, 李宏, 等. 内皮祖细胞条件培养基对 VSMC 增殖、迁移及粘附功能的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2013 (3): 199-202.
- [5] Ha YM, Lee DH, Kim M, et al. High glucose induces connective tissue growth factor expression and extracellular matrix accumulation in rat aorta vascular smooth muscle cells via extracellular signal-regulated kinase 1/2[J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2013, 17 (4): 307-314.
- [6] 揭伟, 罗泊涛, 姜汉国, 等. 高糖上调大鼠主动脉平滑肌细胞骨桥蛋白表达[J]. *基础医学与临床*, 2010 (8): 852-856.
- [7] 高凌云, 李福平, 何作云, 等. FIZZ1 促使血管平滑肌细胞迁移的机制[J]. *中华高血压杂志*, 2008, 16 (4): 326-330.
- [8] Cho A, Reidy MA. Matrix metalloproteinase-9 is necessary for the regulation of smooth muscle cell replication and migration after arterial injury[J]. *Circ Res*, 2002, 91 (9): 845-851.
- [9] Lee YJ, Kim JS, Kang DG, et al. Buddleja officinalis suppresses high glucose-induced vascular smooth muscle cell proliferation: role of mitogen-activated protein kinases, nuclear factor-kappaB and matrix metalloproteinases[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2010, 235 (2): 247-255.
- [10] Li H, Hontani N, Toshida I, et al. Group IVA phospholipase A2-associated production of MMP-9 in macrophages and formation of atherosclerotic lesions[J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31 (3): 363-368.
- [11] 路艳, 张春艳, 王聪霞, 等. 高糖对 MMP-2 与 TIMP-2 的表达及血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2012, 33 (3): 312-315.

(此文编辑 文玉珊)