

# 香烟烟雾提取物对小鼠血管平滑肌细胞的损伤作用及表型转变的影响

宁 静<sup>1</sup>, 张 松<sup>2</sup>, 张余杭<sup>3</sup>

(郑州市第九人民医院 1. 老年二科, 2. 眼科, 3. 病理科, 河南省郑州市 450053)

[ 关键词 ] 动脉粥样硬化; 血管平滑肌细胞; 香烟烟雾提取物

[ 摘 要 ] **目的** 探讨香烟烟雾提取物(CSE)对小鼠血管平滑肌细胞的损伤作用及表型转变的影响。**方法** 制备 CSE, 分别使用 2.5%、5%、10%、20% CSE 处理小鼠血管平滑肌细胞(MOVAS 细胞), 并以正常 MOVAS 细胞作为对照组。MTT 法检测各浓度 CSE 处理后细胞的存活率, 活性氧(ROS)检测试剂盒检测细胞内 ROS 水平。流式细胞仪结合 PI 单染以及 Annexin V-PI 双染技术分别分析 10% CSE 处理后细胞周期和细胞凋亡率的变化。实时荧光定量 PCR 分析 10% CSE 处理后 MOVAS 细胞内 SMemb 和 SMA 的 mRNA 表达水平, Western blot 检测 10% CSE 处理后 MOVAS 细胞内 SMemb 和 SMA 的蛋白表达水平。**结果** 2.5%、5%、10% 及 20% CSE 处理后, MOVAS 细胞的存活率分别为  $89.6\% \pm 8.6\%$ 、 $65.2\% \pm 10.0\%$ 、 $53.6\% \pm 6.9\%$ 、 $43.1\% \pm 5.9\%$ , 各组与对照组相比差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 各浓度 CSE 处理后细胞内 ROS 水平显著提高。10% CSE 处理后细胞 G1 期比例明显上升, 细胞凋亡率也显著提高, 与对照组相比差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。10% CSE 处理后 MOVAS 合成型标志物 SMemb 的表达水平显著增高, 而收缩型标志物 SMA 的表达水平显著降低。**结论** CSE 可以对小鼠血管平滑肌细胞造成损伤, 并能够使小鼠血管平滑肌细胞表型由收缩型向合成型转变, 其机制可能与 CSE 引起的细胞内 ROS 增高有关。

[ 中图分类号 ] R363

[ 文献标识码 ] A

## Injury Effect and Phenotype Change on Mouse Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Cigarette Smoke Extract

NING Jing<sup>1</sup>, ZHANG Song<sup>2</sup>, and ZHANG Yu-Hang<sup>3</sup>

(1. Second Department of Geriatrics, 2. Department of Ophthalmology, 3. Department of Pathology, The 9th People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou, Henan 450053, China)

[ KEY WORDS ] Atherosclerosis; Vascular Smooth Muscle Cell; Cigarette Smoke Extract

[ ABSTRACT ] **Aim** To explore injury action and phenotype shift on mouse vascular smooth muscle cells by cigarette smoke extract (CSE). **Methods** CSE was prepared, 2.5%, 5%, 10% and 20% of CSE was respectively used to treat mouse vascular smooth muscle cells (MOVAS cells), and normal MOVAS cells were used as control group. Cell survival rate was detected by MTT assay. Intracellular reactive oxidative species (ROS) level was estimated by ROS kit. MOVAS cell cycle and apoptotic rate were respectively analyzed by flow cytometry instrument combining PI simple staining and Annexin V-PI double staining. SMemb and SMA mRNA expression of MOVAS cells were analyzed by real-time quantitative PCR, SMemb and SMA protein expression of MOVAS cells were measured by Western blot. **Results** After 2.5%, 5%, 10% and 20% CSE processed, survival rate of MOVAS cells was respectively  $89.6\% \pm 8.6\%$ ,  $65.2\% \pm 10.0\%$ ,  $53.6\% \pm 6.9\%$  and  $43.1\% \pm 5.9\%$ , the difference was statistically significant compared with the control group ( $P < 0.05$ ), meanwhile, ROS level increased significantly. After 10% CSE processed, the percent of cells in G1 cycle was increased obviously, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). Cell apoptosis rate also increased significantly, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). The expression of SMemb as MOVAS synthetic symbol was significantly increased, while the expression of SMA as contractile symbol was reduced remarkably. **Conclusion** CSE

[ 收稿日期 ] 2014-07-09

[ 修回日期 ] 2014-10-09

[ 作者简介 ] 宁静, 副主任医师, 研究方向为老年内科, E-mail 为 zhengzhou9yningji@163.com。张松, 副主任医师, 研究方向为视网膜血管硬化。张余杭, 副主任医师, 研究方向为心血管病理学。

can injure mouse vascular smooth muscle cells, and promote the transformation of MOVAS cells' phenotype from synthetic to contractile.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是常见的老年病之一,它是一种血管内壁脂质异常沉积造成的血管硬化、管腔变窄,常引发致命性心脑血管事件,严重威胁人类生命健康和生活质量<sup>[1]</sup>。老年人易发生 As 的主要原因为老年人常伴有高血压、心脏病、高血脂、糖尿病,这些都是 As 发生的危险因素<sup>[2]</sup>。当然,吸烟也是一个公认的 As 发生的危险因素。As 的发生机制较为复杂,除脂质代谢异常外,血管结构的损伤也是其主要机制之一。其中血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的结构和功能与 As 的发生有着密切关系<sup>[3]</sup>。各种原因导致的 VSMC 损伤加速脂质向内壁沉积,从而导致血管再狭窄。损伤后 VSMC 凋亡/增殖平衡打破,这与不稳定性斑块的形成有关。此外,VSMC 的表型改变也在 As 的发生中扮演重要角色,VSMC 由收缩型转变为合成型会促进 As 发生<sup>[4]</sup>。香烟烟雾中含有上千种化合物,其中大部分具有强氧化性,能够损伤血管内皮细胞和 VSMC 等<sup>[5]</sup>,但具体机制尚未全部阐明。因此本研究探讨香烟烟雾对小鼠平滑肌细胞系 MOVAS 细胞的损伤作用以及对其表型转变的影响,以期进一步揭示香烟烟雾与 As 的关系,为老年人群的戒烟行为提供更多依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料和试剂

小鼠平滑肌细胞 MOVAS 细胞株(北京中原公司),小牛血清(杭州天杭生物制品有限公司),DMEM 培养基(美国 Gibco 公司),MTT 试剂、凋亡检测试剂盒、碘化丙啶(美国 Sigma 公司),ROS 检测试剂盒(北京碧云天生物制品有限公司),RNA 提取试剂盒(美国 QIAGEN 公司),ImProm-II<sup>®</sup> 反转录试剂盒、GO Taq<sup>®</sup> qPCR Master Mix [普洛麦格(北京)生物技术有限公司],兔抗小鼠 SMA 多克隆抗体、兔抗小鼠 SMemb 多克隆抗体、兔抗小鼠  $\beta$ -actin 多克隆抗体、HRP 标记山羊抗兔二抗(美国 Santa Cruz 公司),BCA 蛋白定量试剂盒、Super ECL 超敏发光液(北京普利莱基因技术有限公司)。

### 1.2 细胞培养

MOVAS 细胞使用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基常规培养于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱。0.25% 胰酶消化传代,取状态良好的对数期细胞进行实验。

### 1.3 香烟烟雾提取物的制备

参考 Lee 等<sup>[6]</sup>的方法并根据实际情况加以改进,搭建香烟烟雾提取物(cigarette smoke extract, CSE)采集系统,10 mL 注射器反复抽吸 3 支去过滤嘴香烟产生的烟雾,并将所有烟雾溶于 20 mL 无血清的 DMEM 培养基中,调整 pH 为 7.5,以消毒后的 0.22  $\mu$ m 孔径的过滤器除去细菌和大颗粒杂质。以此溶液作为 100% CSE 原液,其余浓度的 CSE 在此基础上使用无血清的 DMEM 培养基稀释,制备的 CSE 需在 0.5 h 内使用。

### 1.4 MTT 法检测细胞存活率

取对数期 MOVAS 细胞,接种于 96 孔板,常规培养 24 h,待细胞贴壁后将细胞随机分为 5 组,分别为不加 CSE 的对照组、2.5% CSE 组、5% CSE 组、10% CSE 组、20% CSE 组,每组设 5 个平行孔,并设置空白调零孔。各组继续培养 24 h,各孔加入 15  $\mu$ L MTT 试剂后继续培养 4 h,小心弃去上清,150  $\mu$ L DMSO 充分溶解孔底的蓝紫色结晶,酶标仪测定 490 nm 处波长,细胞存活率(%)=(实验组 OD 值/对照组 OD 值)×100%。实验重复 5 次。

### 1.5 细胞内 ROS 的检测

细胞分组和处理同 1.4,各浓度 CSE 处理细胞 24 h 后,小心吸取培养液,消化细胞,将细胞重悬浮于含有终浓度为 10  $\mu$ mol/L 荧光探针 DCFH-DA 的无血清培养液中。混匀后放入培养箱避光孵育 0.5 h,800 r/min 离心 5 min,去除上清,使用无血清培养基小心反复洗涤、离心 3 次,洗去残留探针。用 2 mL PBS 重新悬浮细胞,确保细胞密度为  $1 \times 10^9$ /L,使用荧光酶标仪上机测量细胞荧光强度,激发波长 488 nm,发射波长 525 nm。实验重复 5 次。

### 1.6 细胞周期分析

细胞分为对照组、10% CSE 组,培养 24 h 后,收集细胞,使用预冷的冰 PBS 洗涤细胞,然后使用 70% 预冷乙醇,4℃ 固定 12 h。接着,使用 PBS 再次洗涤细胞,加入 50 mg/L 碘化丙啶 500  $\mu$ L,4℃ 避光染色 30 min。随后,使用流式细胞仪分析细胞周期。实验重复 5 次。

### 1.7 细胞凋亡分析

将细胞分为对照组、10% CSE 组,培养 24 h 后,收集细胞,使用预冷的冰 PBS 洗涤细胞,离心后使用 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒中的缓冲液 500  $\mu$ L 重悬细胞。依次加入 5  $\mu$ L Annexin V 以及

10 μL 碘化丙啶, 常温避光静置 10 min 后, 使用流式细胞仪分析细胞凋亡率。实验重复 5 次。

1.8 实时荧光定量 PCR 检测 SMemb 和 SMA 的 mRNA 表达

将细胞分为对照组、10% CSE 组, 常规培养 24 h, 使用 RNA 提取试剂盒提取细胞 RNA。使用 Im-Prom- II® 反转录试剂盒对提取出的 RNA 进行反转录, 以合成 cDNA。使用 GO Taq® qPCR Master Mix 试剂盒对上述合成的 cDNA 进行 PCR 扩增。SMemb 上游引物为 5'- AGA GAG ACC TGC CAA TCC C-3', 下游引物为 5'- TTC CAA AGC TCA GCC ACA AA-3', SMA 上游引物为 5'-CGA TAA ACA CGG CAT CAT C-3', 下游引物为 5'-CAT CAG GCA GTT CGT AGC TC-3', 内参 β-actin 上游引物为 5'-TGG CAC CCA GCA CAA TGA A-3', 下游引物为 5'-CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGA AGC A-3'。使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 分析各样本的 SMemb 和 SMA 的相对表达情况。实验重复 5 次。

1.9 Western blot 检测 SMemb 和 SMA 的蛋白表达

将细胞分为对照组、10% CSE 组, 常规培养 24 h。使用含 1% 蛋白酶抑制剂混合物的 RIPA 蛋白裂解液 (每孔 500 μL) 裂解细胞 10 min, 4℃、12000 g 离心, 取上清。使用 BCA 蛋白定量分析盒, 按说明书确定每孔蛋白的浓度。将总蛋白样本与 5 × 上样缓冲液混匀, 煮沸 5 min 后上样, 每孔上样量保证为 25 μg。使用 12% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 电压为 110 V, 时间为 1.5 h。冰浴中 PVDF 转膜, 转膜条件为恒流 200 mA, 时间为 1.5 h。转膜结束后, 使用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。分别使用兔抗小鼠 SMA 多克隆抗体 (1: 1000)、兔抗小鼠 SMemb 多克隆抗体 (1: 1000)、兔抗小鼠 β-actin 多克隆抗体 (1: 1500) 4℃ 孵育 12 h。接着使用 PBST 洗涤 3 次, 除去未结合的一抗。使用 HRP 标记的二抗避光孵育膜 2 h。用 ECL 发光试剂盒处理膜条, 曝光显影后分析蛋白条带。实验重复 5 次。

1.10 统计学方法

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 CSE 对 MOVAS 细胞增殖的影响

2.5%、5%、10% 及 20% CSE 处理后, MOVAS 细胞的存活率分别为 89.6% ± 8.6%、65.2% ± 10.0%、53.6% ± 6.9%、43.1% ± 5.9%, 与对照组

相比差异具有统计学意义 (*P* < 0.05), 不同浓度 CSE 组间相比差异也均具有统计学意义 (*P* < 0.05), 且抑制程度与 CSE 浓度呈依赖关系。CSE 对 MOVAS 细胞的半数致死量为 14.3%, 为便于稀释随后实验以 10% CSE 进行 (图 1)。

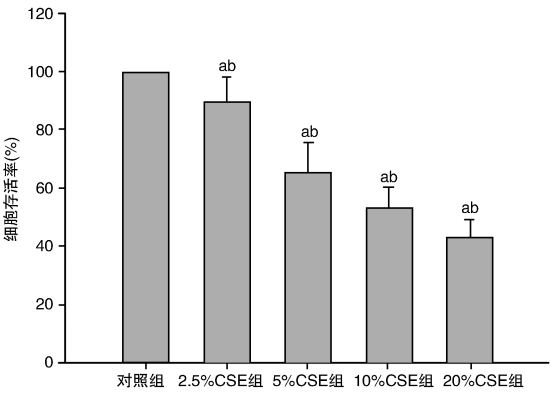


图 1. CSE 对 MOVAS 细胞的增殖抑制作用 a 为 *P* < 0.05, 与对照组比较; b 为 *P* < 0.05, 不同浓度 CSE 组间比较。

Figure 1. CSE inhibits the proliferation of MOVAS cells

2.2 CSE 对 MOVAS 细胞 ROS 水平的影响

不同浓度 CSE 处理 MOVAS 细胞后, 与对照组相比, 细胞内荧光密度显著提高, 差异具有统计学意义 (*P* < 0.05), 不同浓度 CSE 组间相比差异也均具有统计学意义 (*P* < 0.05)。提示 CSE 处理可以引起细胞内 ROS 水平增高 (图 2)。

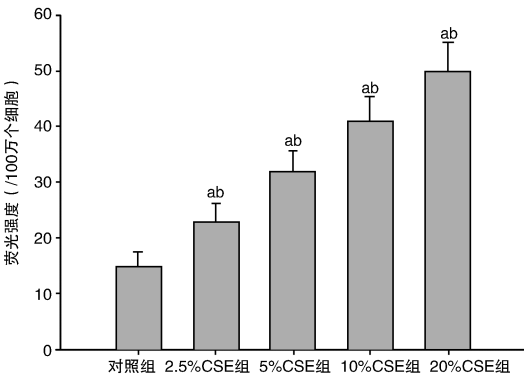


图 2. CSE 对 MOVAS 细胞内 ROS 水平的影响 a 为 *P* < 0.05, 与对照组比较; b 为 *P* < 0.05, 不同浓度 CSE 组间比较。

Figure 2. The effect of CSE on ROS level of MOVAS cells

2.3 CSE 对 MOVAS 细胞周期及细胞凋亡率的影响

正常 MOVAS 细胞 G1 期细胞比例为 53.6% ± 7.6%, G2 期细胞比例为 15.5% ± 3.9%; 经 10% CSE 处理后, G1 期细胞比例上升为 69.9% ±

11.2% ,G2 期细胞下降为  $9.8\% \pm 3.8\%$  ,与对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) 。对照组细胞凋亡率仅为  $7.8\% \pm 1.6\%$  ,10% CSE 处理后,细胞凋亡率提高到  $23.3\% \pm 5.6\%$  ,与对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.05$  ;图 3 和 4) 。

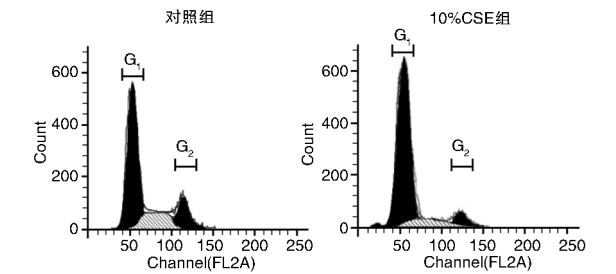


图 3. 对照组和 10% CSE 组 MOVAS 细胞周期分析  
Figure 3. Cell cycle analysis of MOVAS cells in control and 10% CSE treated group

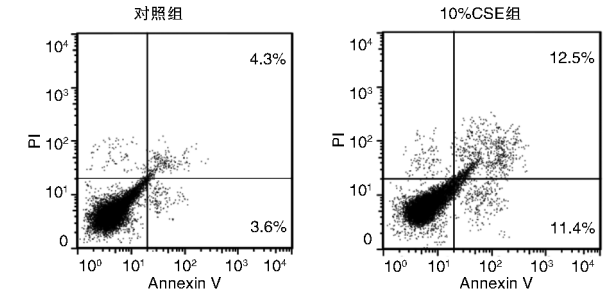


图 4. 对照组和 10% CSE 组 MOVAS 细胞凋亡情况  
Figure 4. Apoptosis analysis of MOVAS cells in control and 10% CSE treated group

2.4 CSE 对 MOVAS 细胞 SMemb 和 SMA 的表达影响

10% CSE 处理后,MOVAS 细胞合成型标志蛋白 SMemb 的表达相对于对照组提高了  $1.60 \pm 0.09$  倍,而收缩型标志物 SMA 的表达相对于对照组降低了  $0.68 \pm 0.10$  倍 ( $P < 0.05$ ) 。Western blot 分析显示,10% CSE 处理后 MOVAS 细胞 SMemb 的表达显著增高,SMA 的表达显著下降(图 5 和 6) 。

3 讨 论

戒烟教育是老年人健康教育的重要部分,因为吸烟是众多疾病诸如高血压、糖尿病、恶性肿瘤的危险因素,当然吸烟也是公认的导致 As 发生的风险因素<sup>[7,8]</sup>。香烟烟雾中含有数千种氧化剂以及可产生自由基等氧化性物质对各种细胞产生杀伤作用,具体机制涉及烟雾中的氧化成分导致细胞内 ROS

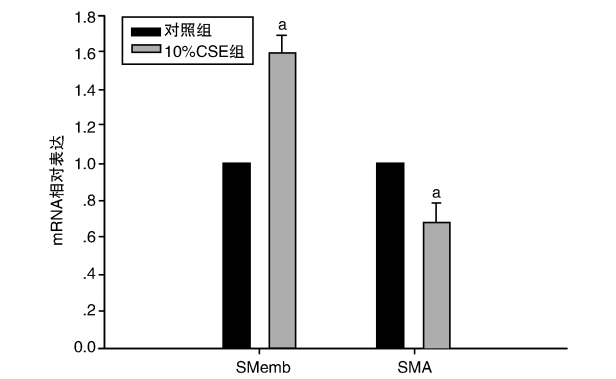


图 5. 10% CSE 处理后 MOVAS 细胞 SMemb 和 SMA mRNA 的表达变化 a 为  $P < 0.05$  ,与对照组比较。  
Figure 5. SMemb and SMA mRNA expressions in MOVAS cells after 10% CSE treatment

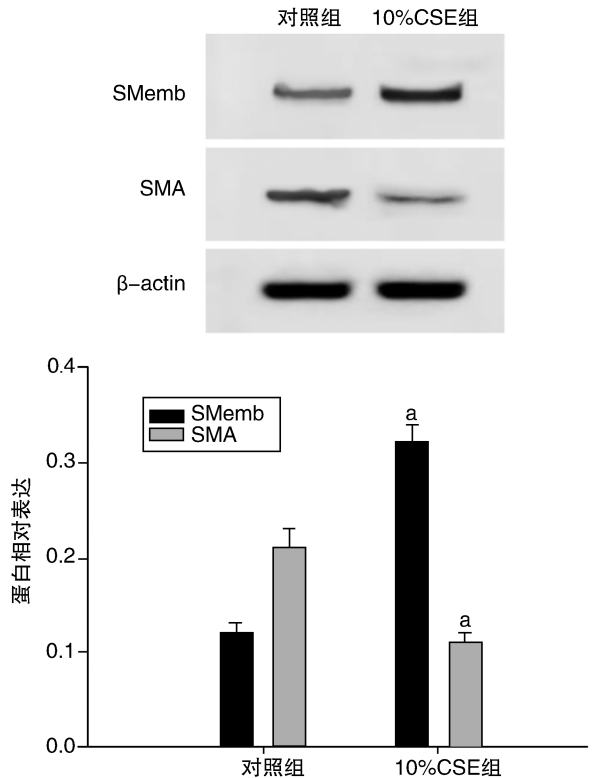


图 6. CSE 处理后 MOVAS 细胞 SMemb 和 SMA 蛋白的表达变化 a 为  $P < 0.05$  ,与对照组比较。  
Figure 6. SMemb and SMA protein expressions in MOVAS cells after 10% CSE treatment

增多,引起氧化应激<sup>[9]</sup>。细胞氧化应激进一步导致细胞凋亡、DNA 损伤、线粒体损伤等,严重影响细胞的结构和功能<sup>[10]</sup>。本研究中发现不同浓度的 CSE 处理小鼠血管平滑肌细胞系 MOVAS 细胞后,MOVAS 细胞的增殖受到抑制,且与 CSE 浓度呈依赖关系。同时 CSE 可以导致 MOVAS 细胞出现细胞周期 G1 期阻滞,且出现显著的凋亡现象。说明 CSE 确



实对 MOVAS 细胞有损伤作用。As 的发生过程中始终存在着 VSMC 的增殖和凋亡,二者相互平衡,在 As 发生的时期分别占据主导地位。早期纤维帽形成时,以 VSMC 的增殖过度为主,而到了 As 发展的中后期,VSMC 的凋亡增多,导致不稳定性斑块形成,与并发的血栓、出血也有关系。此外,VSMC 的凋亡会导致炎症因子释放,形成局部炎症,加重病情<sup>[11,12]</sup>。本研究发现香烟烟雾导致的 VSMC 凋亡,暗示吸烟会加重 As 的发展。

本研究中,10% CSE 处理 MOVAS 细胞后,收缩型标志物 SMA 的表达显著降低,而合成型标志物 SMem 的表达明显增多。提示香烟烟雾使 MOVAS 细胞发生了由收缩型向合成型的转换。VSMC 的表型向合成型转换后,其收缩功能消失,而分泌功能增强,迁移至内膜下间隙大量增殖,促进 As 的发生<sup>[13]</sup>。总之,VSMC 的表型转换是 As 发生的基础,也是治疗后血管再次狭窄的重要因素。研究发现香烟烟雾不仅能促进 VSMC 的凋亡,恶化 As 病情,也能通过影响 VSMC 的表型来促发 As。因此香烟烟雾对 As 的不同时期均有不良影响,未来研究应当进一步揭示相关机制,并力求找到具有保护作用的药物。总之,CSE 造成 VSMC 损伤的同时会导致其表型由收缩型向合成型转变。

[参考文献]

[1] Maroules CD, Rosero E, Ayers C, et al. Abdominal aortic atherosclerosis at MR imaging is associated with cardiovascular events: the Dallas heart study[J]. Radiology, 2013, 269 (1): 84-91.

[2] Snyder ML, Love SA, Sorlie PD. Redistribution of heart failure as the cause of death: the Atherosclerosis Risk in Communities Study [J]. Popul Health Metr, 2014, 12 (1): 10.

[3] Li F, Yu X, Szykarski CK, et al. Activation of GPER induces differentiation and inhibition of coronary artery smooth muscle cell proliferation[J]. PLoS One, 2013, 8 (6): e64771.

[4] 王泽慧, 边云飞, 卫娜, 等. 大鼠 microRNA-145 慢病毒表达载体的构建及其对血管平滑肌细胞表型转化的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20 (5): 424-428.

[5] Wang R, Xu YJ, Liu XS, et al. CCN2 promotes cigarette smoke-induced proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells through upregulating cyclin D1 expression[J]. J Cell Biochem, 2012, 113 (1): 349-359.

[6] Lee SD, Lee DS, Chun YG, et al. Cigarette smoke extract induces endothelin-1 via protein kinase C in pulmonary artery endothelial cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001, 281 (2): L403-411.

[7] He BM, Zhao SP, Peng ZY. Effects of cigarette smoking on HDL quantity and function: implications for atherosclerosis[J]. J Cell Biochem, 2013, 114 (11): 2 431-436.

[8] 张晶, 关欣, 王伟, 等. 血脂代谢与颈动脉粥样硬化不稳定性斑块的相关性[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20 (9): 833-836.

[9] van Rijt SH, Keller IE, John G, et al. Acute cigarette smoke exposure impairs proteasome function in the lung [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 303 (9): L814-823.

[10] Lee YH, Cheng FY, Chiu HW, et al. Cytotoxicity, oxidative stress, apoptosis and the autophagic effects of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts[J]. Biomaterials, 2014, 35 (16): 4 706-715.

[11] Li F, Xia K, Sheikh MS, et al. Retinol binding protein 4 promotes hyperinsulinism-induced proliferation of rat aortic smooth muscle cells[J]. Mol Med Rep, 2014, 9 (5): 1 634-640.

[12] Silverman-Gavrila R, Silverman-Gavrila L, Bendeck MP. Cell division fidelity is altered during the vascular response to injury: its novel role in atherosclerosis progression[J]. Am J Pathol, 2013, 182 (3): 628-639.

[13] Shi F, Long X, Hendershot A, et al. Fibronectin matrix polymerization regulates smooth muscle cell phenotype through a Rac1 dependent mechanism[J]. PLoS One, 2014, 9 (4): e94988.

(此文编辑 文玉珊)