

胆固醇对血管平滑肌细胞增殖及迁移的作用

束波¹, 刘志江², 钱民章¹

(遵义医学院 1.生物化学与分子生物学教研室,2.第一附属医院心内科,贵州省遵义市 563000)

[关键词] 胆固醇; 血管平滑肌细胞; 增殖; miR-145

[摘要] 目的 探讨胆固醇对血管平滑肌细胞增殖及迁移的作用。方法 体外培养人血管平滑肌细胞株(VSMC),以 12.5 mg/L、25.0 mg/L、50.0 mg/L 不同浓度胆固醇(CH)分别作用细胞 24 h、48 h、72 h 后,MTT 法检测 VSMC 的增殖情况;流式细胞术检测细胞进入 S 期的数量;EDU 试剂盒检测 CH 作用后细胞的 DNA 合成;划痕实验检测 VSMC 迁移情况;Real-time PCR 检测细胞中 miR145 的表达水平。结果 12.5 mg/L、25.0 mg/L、50.0 mg/L CH 作用 VSMC 后可增加细胞活力,促进细胞增殖,与对照组比较,进入 S 期的 VSMC 细胞数量明显增多,细胞迁移增加($P<0.05$);与对照组比较,25.0 mg/L、50.0 mg/L CH 可诱导 VSMC DNA 合成增加,并且明显降低 miR-145 的表达水平($P<0.05$)。结论 CH 可诱导 VSMC 进入 S 期细胞增多,促进细胞增殖,并且增加细胞的 DNA 合成及细胞迁移,其机制可能与抑制 miR-145 的表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of cholesterol on proliferation and migration of vascular smooth muscle cells

SHU Bo¹, LIU Zhi-Jiang², QIAN Min-Zhang¹

(1.Department of Biochemistry and Molecular Biology;2.Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563003, China)

[KEY WORDS] Cholesterol; Vascular smooth muscle cells; Proliferation; miR-145

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of cholesterol (CH) on proliferation and migration of vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** VSMCs were treated with 12.5 mg/L, 25.0 mg/L, 50.0 mg/L CH. VSMC activity were analyzed by MTT kit, the percentage of DNA synthesis were detected by EdU kit, the percentage of S phase cell numbers were measured by flow cytometry and VSMC migrations were detected by scratch assay. The expression of miR145 was analyzed by real-time quantitative PCR. **Results** 12.5 mg/L, 25.0 mg/L, 50.0 mg/L CH can increase VSMC proliferation, migration and the percentage of S phase cell numbers ($P<0.05$). 25.0 mg/L, 50.0 mg/L CH promoted DNA synthesis percentage of VSMC, decreased the expression of miR-145 in VSMC ($P<0.05$). **Conclusion** Cholesterol increased the percentage of S phase VSMC number, cells proliferation, DNA synthesis and migration, and miR-145 may be involved in these processes.

脂质代谢异常所致的高脂血症被认为是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)形成的首要独立危险因素。临床研究发现血清胆固醇(cholesterol, CH)水平越高,As 和冠心病的发病率就越高^[1]。脂质代谢发生障碍时,CH 的转运失调导致 CH 沉积。在人类和实验动物用高 CH 饮食诱导产生的 As 斑块中,均发现血管细胞内及细胞间有大量游离 CH 及其酯的沉积^[2-3]。但这些游离 CH 通过何种途径对血管

内皮细胞、平滑肌细胞产生损伤,如何促进 As 的发展,尚不清楚。本研究旨在探讨 CH 对血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)增殖、迁移的影响。miRNA-145(miR-145)是 VSMC 中表达最丰富的 microRNA,并参与调控细胞的增殖^[4],研究将初步探讨 CH 对 VSMC 增殖的影响是否与 miR-145 有关,该研究对于深入认识游离胆固醇在 As 发生、发展中的作用有着重要意义。

[收稿日期] 2016-10-19

[修回日期] 2017-01-17

[基金项目] 贵州省中医药管理局中医药、民族医药科学技术研究课题(QZYY-2015-152);遵义医学院 2012 招标课题(F-613)

[作者简介] 束波,博士,副教授,研究方向为动脉粥样硬化发病机理,E-mail 为 shubo1014@126.com。通讯作者钱民章,教授,博士研究生导师,研究方向为动脉粥样硬化发病机理,E-mail 为 qian_mzh@hotmail.com。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

人升主动脉平滑肌细胞(human aortic vascular smooth muscle cell, HA-VSMC)由中南大学湘雅中心实验室细胞库提供。DMEM 高糖培养基、胎牛血清(FBS)(美国, Hyclone 公司)。胆固醇、Hoechst 33342 染料、碘化丙啉(propidium iodide, PI)(美国, Sigma 公司)。噻唑蓝(MTT)检测试剂盒、Edu 检测试剂盒(广州锐博生物科技有限公司)。Trizol(美国 Invitrogen 公司)。RT-PCR 相关试剂盒、SYBR 荧光探针(大连宝生物工程有限公司)。PCR 引物由上海生工生物工程公司合成。其余试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养及分组

VSMC 培养在 5% CO₂、37℃ 培养箱中。所有的细胞培养工作在无菌超净台进行。取生长至 80% 密度的细胞, PBS 冲洗 3 次。加入 1 mL 0.25% 胰蛋白酶, 观察细胞消化情况。加入 2 mL 完全培养基, 形成细胞悬液。室温 1000 r/min 离心 3 min, 重悬细胞, 培养箱培养。实验分组: 观察不同剂量 CH 对 VSMC 细胞增殖、细胞迁移的影响。因 CH 为粉末状, 溶于微量乙醇中使用, 分组中另设置了溶剂对照组。CH 的浓度梯度参照本课题组前期研究结果^[5]。具体分组如下: 对照组(Control 组)、无水乙醇溶剂组(Vehicle 组)、12.5 mg/L CH 组、25.0 mg/L CH 组、50.0 mg/L CH 组。

1.3 MTT 法检测细胞活力绘制细胞增殖曲线

培养细胞消化后制备单细胞悬液, 分别以 1×10³/孔密度均匀地接种于 96 孔培养板上。1% 血清培养基作用使细胞同步化后分组处理细胞。分组进行培养, 分别在培养后 24 h、48 h、72 h 加入 MTT 试剂, 孵育 4 h 后, 酶标仪读取 A₄₉₀ 数据。根据公式计算细胞增殖率(%) = (实验组 A₄₉₀ - A₁)/A₁ × 100%(A₁ 为各组第 24 h 吸光度值), 绘制细胞增殖曲线。

1.4 流式细胞术检测细胞增殖情况

流式细胞术(flow cytometry, FCM)检测细胞增殖情况。VSMC 以 1×10⁵ 个/孔密度接种于 6 孔板中培养 6 h, 细胞同步化, 分组处理细胞。胰酶消化细胞, PBS 洗 3 次, 70% 乙醇固定过夜。每组加入培养基稀释 1000 倍的 PI 染液避光处理细胞 10 min。每组经流式细胞仪检测和分析最少 10000 个细胞, 得到各实验组细胞 S 期细胞百分比含量。

1.5 Edu 检测细胞 DNA 合成情况

VSMC 以 1×10³ 个/孔密度接种于 96 孔板中, 同步化后分组培养细胞 48 h。换含 Edu 的培养液培养 3 h, PBS 润洗 3 次, 每次 5 min。每孔加入甲醇 15 min 固定细胞, PBS 润洗 3 次, 每次 5 min。细胞加入适量荧光反应液, 避光反应 30 min; 加入适量 Hoechst 33342, 避光作用 15 min; PBS 润洗 3 次, 每次 10 min。荧光显微镜下观察细胞并拍照, 随机选取 5 个视野。计数相同视野下 Edu 标记阳性的绿色细胞及 Hoechst 33342 标记的蓝色总细胞数, 计算 DNA 合成率。

1.6 划痕实验检测细胞迁移

6 孔板底部中间划一条直线。VSMC 以 1×10⁵ 个/孔密度接种于 6 孔板中。同步化后分组培养。细胞培养 24 h 后用枪头按照直线划过细胞。用 PBS 洗细胞 3 次, 拍照记为 0 h。加入无血清培养基及相应药物处理。放入细胞培养箱, 继续培养。24 h 后取样, 拍照, 测量 0 h 初始划痕宽度以及 24 h 处理后划痕宽度值。计算相对迁移率 = 1 - (处理后划痕宽度/初始划痕宽度)。

1.7 Real time PCR 检测细胞 miRNA-145 的表达

VSMC 以 1×10⁵ 个/孔密度接种于 6 孔板中, 细胞分组培养 48 h。每孔加入 Trizol 1 mL 提取细胞 RNA, 测定浓度并逆转录合成 cDNA。以此 cDNA 为模板进行 Real-time PCR 扩增反应。引物序列为: hsa-miR-145 F Primer: 5'-ATT ATA TTG TCC AGT TTT CCC AGG-3'; hsa-miR-145 R Primer: 5'-AAA GGT TGTT CTC CAC TCT CTC TC-3'。U6 是内参基因: U6 snRNA F Primer: 5'-ATT GGA ACG ATA CAG AGA AGA TT-3'; U6 snRNA R Primer: 5'-GGA ACG CTT CAC GAA TTT G-3'。设 2 个复孔, 独立实验重复 3 次。反应条件为: 95℃ 3 min; 95℃ 12 s; 62℃ 40 s(40 个循环), 根据 Ct 值经 2^{-(ΔΔCT)} 分析, 得到相对表达量。

1.8 统计学处理

SPSS18.0 软件包进行分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。主要统计指标均行正态性分布, 方差齐性检验, 多组间分析采用单因素方差, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胆固醇对血管平滑肌细胞增殖的影响

根据 OD 值计算不同浓度 CH 作用 VSMC 后细

胞 48 h 及 72 h 增殖率,作出细胞增殖曲线图(图 1)。与对照组比较,12.5 mg/L、25.0 mg/L、50.0 mg/L CH 作用 VSMC 48 h、72 h 均可促进细胞增殖($P<0.05$);25.0 mg/L、50.0 mg/L CH 促增殖作用尤为显著($P<0.01$,表 1)。

表 1. MTT 法检测胆固醇作用对平滑肌细胞活力(OD)的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1. Effect of cholesterol on the activity of smooth muscle cells (OD) by MTT($\bar{x}\pm s, n=3$)

分 组	24 h	48 h	72 h
Control 组	0.22±0.02	0.33±0.02	0.43±0.04
Vehicle 组	0.21±0.02	0.32±0.02	0.42±0.05
12.5 mg/L CH 组	0.22±0.02	0.36±0.03 ^a	0.46±0.05 ^a
25.0 mg/L CH 组	0.24±0.01	0.40±0.02 ^b	0.52±0.01 ^b
50.0 mg/L CH 组	0.24±0.01	0.43±0.02 ^b	0.56±0.03 ^b

a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,与 control 组比较。

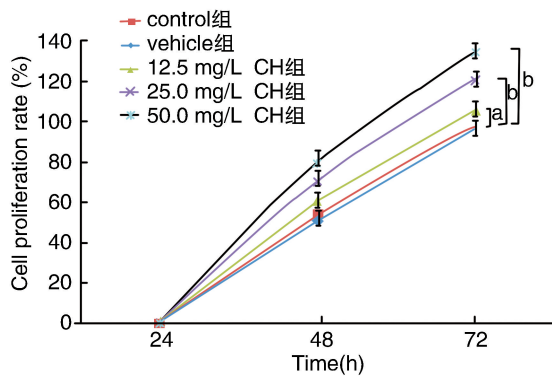


图 1. CH 作用 VSMC 的增殖曲线 a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,与 Control 组比较。

Figure 1. VSMC proliferation curve induced by CH

2.2 胆固醇对血管平滑肌细胞 S 期细胞数量的影响

不同浓度 CH 作用 VSMC 48 h 后,用 PI 单染细胞,流式分析 VSMC 的 S 期细胞百分比见图 2。从表 2 可见,12.5 mg/L CH 组与对照组比较,可促进 VSMC 的 S 期细胞数量增加($P<0.05$),而 25.0 mg/L、50.0 mg/L CH 作用细胞后 S 期的细胞数量增加更为明显($P<0.01$)。提示,不同浓度 CH 作用细胞 48 h 均可促进 S 期细胞数量,诱导 VSMC 增殖。

2.3 胆固醇对血管平滑肌细胞 DNA 合成的影响

不同浓度 CH 作用细胞 48 h 后,Edu 掺入细胞核 DNA,镜下观察并计数 Hoechst 33342 染色的蓝色总细胞数以及 Edu 标记的正在进行 DNA 合成的绿色细胞(图 3),计算 DNA 合成百分率,统计结果见图 4。结果显示:12.5 mg/L CH 组 DNA 合成率虽

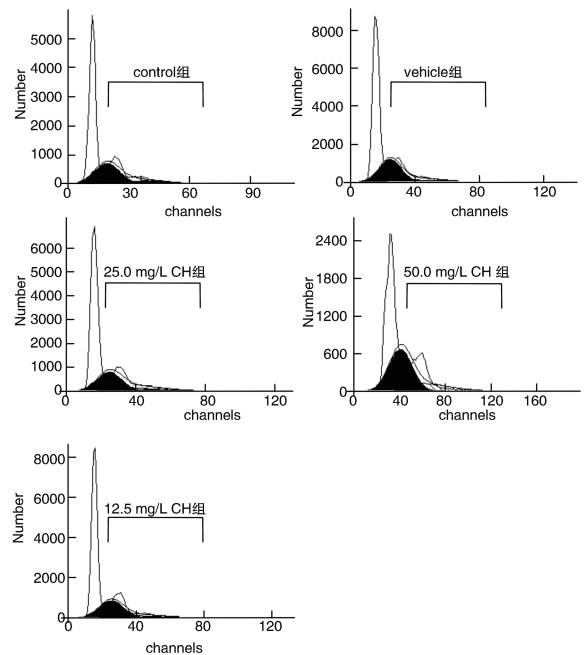


图 2. 流式检测 CH 对 VSMC S 期细胞数量的影响

Figure 2. FCM analyzed percentage of S phase VSMC numbers induced by CH

表 2. 胆固醇作用对平滑肌细胞 S 期细胞数量的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2. The percentage of S phase cell numbers induced by CH($\bar{x}\pm s, n=3$)

分 组	S 期细胞数量(%)
Control 组	10.17±4.30
Vehicle 组	12.76±2.81
12.5 mg/L CH 组	18.93±1.15 ^a
25.0 mg/L CH 组	24.08±1.54 ^b
50.0 mg/L CH 组	29.88±2.85 ^b

a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,与 Control 组比较。

比正常组增加,但是统计学无明显差异。25.0 mg/L、50.0 mg/L CH 作用时 VSMC 的 DNA 合成率与对照组比较明显增加($P<0.05$),以 50.0 mg/L 组最为明显($P<0.01$),提示 25.0 mg/L、50.0 mg/L CH 作用细胞 48 h 可诱导细胞的 DNA 合成。

2.4 胆固醇对血管平滑肌细胞迁移的影响

细胞分组划痕标记,不同浓度 CH 作用 VSMC 24 h 后检测 CH 各剂量组与对照组细胞迁移相对距离(图 5),发现 12.5 mg/L、25.0 mg/L、50.0 mg/L CH 均可增强细胞迁移($P<0.05$),以 50.0 mg/L 剂量组最为明显($P<0.01$)。计算细胞相对迁移率(图 6),提示不同剂量 CH 作用细胞 24 h 能促进 VSMC 划痕修复,增加细胞的迁移能力。

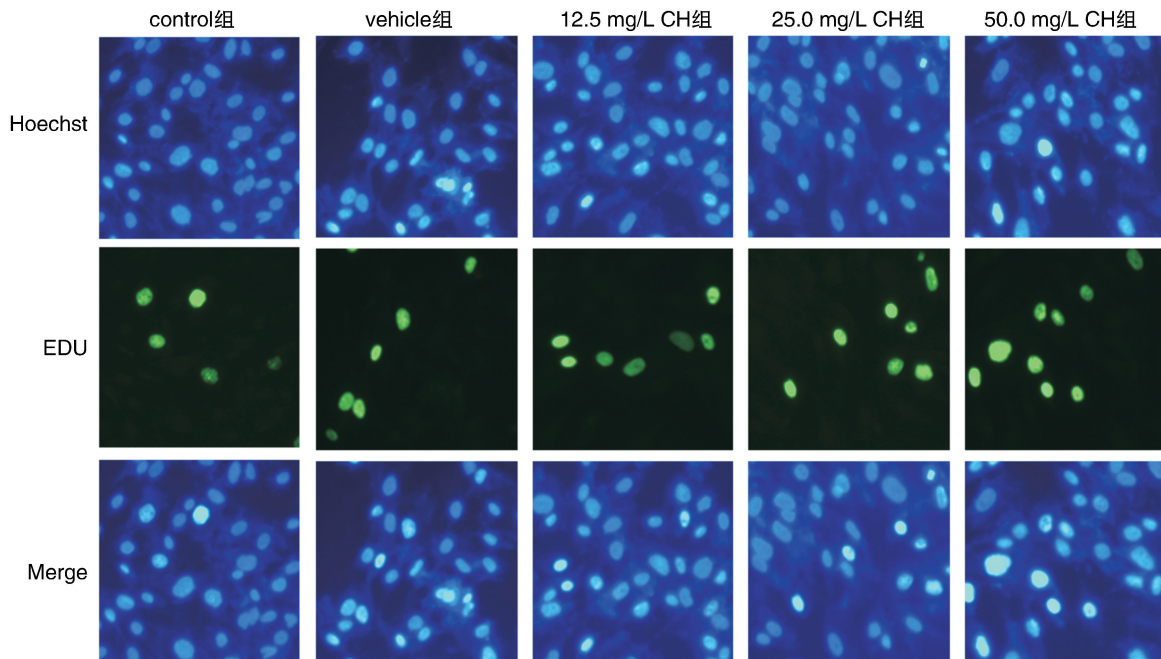


图 3. 镜下观察胆固醇对血管平滑肌细胞 DNA 合成的影响 (×200)

Figure 3. Effects of cholesterol on DNA synthesis of vascular smooth muscle cells under microscope (×200)

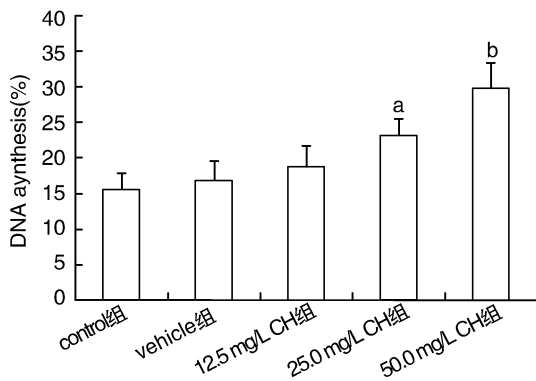


图 4. CH 对 VSMC DNA 合成百分率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 Control 组比较。

Figure 4. Effect of CH on the synthesis percentage of VSMC DNA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5 胆固醇对 VSMC 中 miR-145 表达的影响

RT-PCR 结果显示,与对照组比较,25.0 mg/L 及 50.0 mg/L CH 作用 48 h 后可明显降低 VSMC 中 miR-145 的表达量 ($P < 0.05$),以 50.0 mg/L CH 作用最为明显 ($P < 0.01$) (图 7),而 12.5 mg/L CH 则无此作用。结果提示:25.0 mg/L 及 50.0 mg/L CH 作用 VSMC 48 h 后,细胞内 miR-145 量的表达减少。

3 讨论

高脂血症时,体内血脂尤其是 CH 代谢异常,在血管壁组织细胞间有大量的 CH 沉积。因此了解这些 CH 对血管壁细胞的伤害和影响,对认识高脂诱

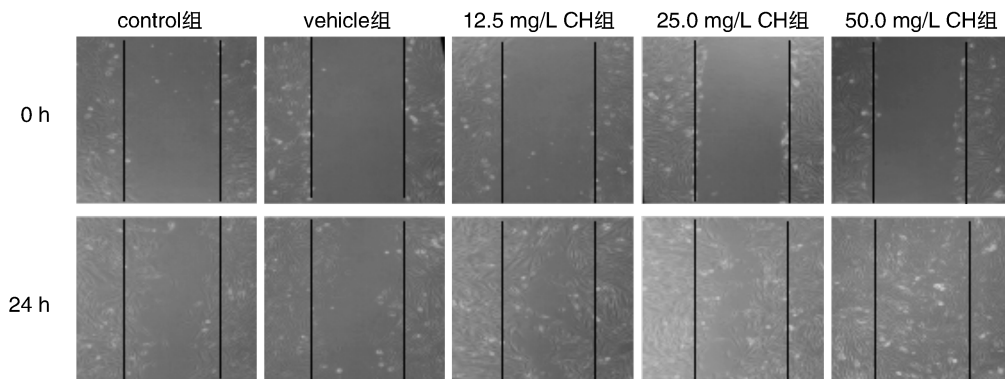


图 5. CH 诱导 VSMC 迁移 ($n=3$)

Figure 5. CH induced VSMC migration ($n=3$)

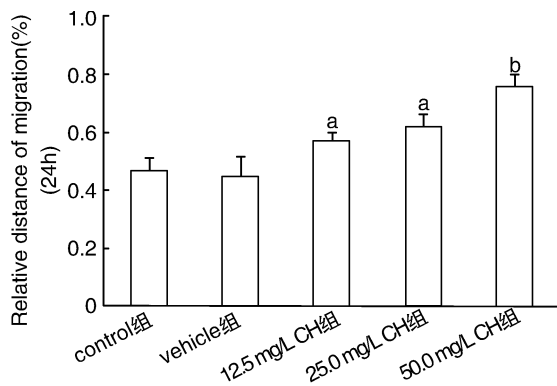


图 6. 胆固醇对血管平滑肌细胞迁移率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与 Control 组比较。

Figure 6. Effects of cholesterol on the migration of vascular smooth muscle cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

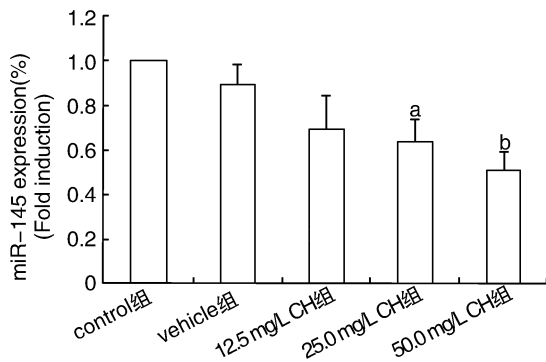


图 7. 胆固醇对 VSMC 中 miR-145 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与 Control 组比较。

Figure 7. Effect of cholesterol on the expression of miR-145 in VSMC($\bar{x}\pm s, n=3$)

导 As 的机制很有必要。As 发生早期, VSMC 受到各种因素刺激从正常血管的分化状态逐渐过渡到增殖活跃、迁移力强的去分化状态, 去分化型 VSMC 能表达更多的低密度脂蛋白受体, 吞噬脂质形成较多的泡沫细胞, 分泌细胞外基质能力增加, 最终发展成为动脉斑块^[6-7]。本课题组前期实验已证实 CH 可通过激活 NOX4, 增加活性氧水平, 对内皮细胞产生损伤^[8]。CH 刺激 VSMC 可降低细胞分化标志基因 α -平滑肌肌动蛋白(smooth muscle actin, SM-actin) 及平滑肌细胞 SM22 α 表达下降, 诱导 VSMC 发生去分化^[9]。本研究主要在此基础上进一步研究 CH 刺激 VSMC 后细胞活力、细胞周期、迁移等生物学特性的改变。

正常血管内的 VSMC 具有收缩功能而增殖受到抑制, 当血管受到刺激发生损伤时, VSMC 可以重新获得增殖能力^[10]。VSMC 的异常增殖在 As 的发生、发展整个过程中都起着非常重要的作用^[11]。本实验用不同浓度 CH 刺激细胞, 结果显示,

12.5 mg/L、25.0 mg/L、50.0 mg/L 均可增加 VSMC 的活力, 并且 VSMC 在 CH 的诱导下, 进入 S 期的细胞数量明显增多。25.0 mg/L、50.0 mg/L CH 可诱导 VSMC 的 DNA 合成, 细胞周期循环被激活, 细胞增殖和凋亡之间的相对平衡被打破, VSMC 发生了异常增殖。VSMC 从中膜向内膜的迁移是动脉粥样硬化斑块形成、血管狭窄的关键步骤^[12]。因此, 本研究进一步检测了 CH 对细胞迁移的影响, 结果显示, 12.5 mg/L、25.0 mg/L、50.0 mg/L CH 均可增强细胞迁移, 促进划痕后细胞的修复。以上结果提示, 高胆固醇血症时, CH 的堆积可有效刺激 VSMC 发生去分化状态的改变, 细胞增殖增多、并从中膜迁移至内膜, 吞噬脂质形成肌源性泡沫化细胞, 这是促进粥样斑块形成的原因之一。

microRNA 是长约 22 个核苷酸的单链、内源性的非编码小 RNA, 通过与靶 mRNA 结合而对基因表达进行转录后水平的调控^[13]。临床研究发现 miRNA 与动脉粥样硬化的发生有密切的关系, 在冠心病患者血浆中 miR-145 也显著减少^[14-16]。动物实验发现在 miR-145 缺陷小鼠中, VSMC 丧失收缩能力, 增殖增加^[17]。而过表达 miR-145 可以诱导 VSMC 中 SM-actin 的表达增加, 抑制 VSMC 增殖及去分化^[18]。以上研究均说明在 VSMC 中表达最多的 miRNA 即 miR-145, 起着维持 VSMC 分化状态的作用。因此, 本实验检测了 CH 诱导下 VSMC 中 miR-145 的表达水平。结果发现, 25.0 mg/L、50.0 mg/L CH 可明显降低 miR-145 的表达量。结果提示, CH 刺激 VSMCs 可降低细胞中 miR-145 的表达, 而 miR145 的减少可能是 CH 促进 VSMC 异常增殖及迁移的机制之一。但具体的调控机制有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Rohla M, Haberfeld H, Sinzinger H, et al. Systematic screening for cardiovascular risk at pharmacies [J]. Open Heart, 2016, 3(2): 1 136-142.
- [2] 王琳芳, 杨克恭. 医学分子生物学原理 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 953-956.
- [3] Mahley RW. The role of dietary fat and cholesterol in atherosclerosis and lipoprotein metabolism [J]. West J Med, 1981, 134: 34-42.
- [4] Li Y, Huang J, Jiang Z, et al. MicroRNA-145 regulates platelet-derived growth factor-induced human aortic vascular smooth muscle cell proliferation and migration by targeting CD40 [J]. Am J Transl Res, 2016, 8(4): 1 813-825.

- [5] 汪慧星, 杨一峻, 钱明章. 胆固醇致人血管内皮细胞 DNA 损伤[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012, 28(5): 442-448.
- [6] Bennett MR, Sinha S, Owens GK. Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 692-702.
- [7] Shiny A, Regin B, Mohan V, et al. Coordinated augmentation of NFAT and NOD signaling mediates proliferative VSMC phenotype switch under hyperinsulinemia [J]. *Atherosclerosis*, 2016, 24(6): 257-266.
- [8] 权媛, 钱民章. 胆固醇通过 NADPH 氧化酶诱导 ROS 升高, NF- κ B 激活进而导致内皮细胞损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(8): 1 521-526.
- [9] 束波, 杨一峻, 钱民章. 胆固醇诱导人血管平滑肌细胞表型转化[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(7): 725-730.
- [10] Liao XH, Wang N, Zhao DW, et al. STAT3 protein regulates vascular smooth muscle cell phenotypic switch by interaction with myocardin [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(32): 19 641-652.
- [11] Han JH, Kim Y, Jung SH, et al. Murrayafoline A induces a G0/G1-phase arrest in platelet-derived growth factor-stimulated vascular smooth muscle cells [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2015, 19(5): 421-426.
- [12] Ge X, Chen S, Liu M, et al. Evodiamine attenuates PDGF-BB-induced migration of rat vascular smooth muscle cells through activating PPAR γ [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(12): 28 180-193.
- [13] Salmanidis M, Pillman K, Goodall G. Direct transcriptional regulation by nuclear microRNAs [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 54(8): 304-311.
- [14] Hulsmans M, De Keyzer D, Holvoet P. MicroRNA regulating oxidative stress and inflammation in relation to obesity and atherosclerosis [J]. *FASEB J*, 2011, 25(8): 2 515-527.
- [15] 仲威. miR-145 在动脉粥样硬化发展中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(5): 522-526.
- [16] Jones Buie JN, Goodwin AJ, Cook JA, et al. The role of miRNAs in cardiovascular disease risk factors [J]. *Atherosclerosis*, 2016, 9(16): 31 393-394.
- [17] Yang K, He YS, Wang XQ, et al. MiR-146a inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced lipid accumulation and inflammatory response via targeting toll-like receptor 4 [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585(6): 854-860.
- [18] Chen J, Yin H, Jiang Y, et al. Induction of microRNA-1 by myocardin in smooth muscle cells inhibits cell proliferation [J]. *J. Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(2): 368-375.

(此文编辑 朱雯霞)