

切应力与血管平滑肌细胞对内皮细胞增殖的影响及 TGF β 1 与 p-Akt 信号通路在其中的作用

姜晓华, 姚庆苹, 姜 隽, 纪素英, 齐颖新, 姜宗来

(上海交通大学 力学生物学与医学工程研究所, 上海 200240)

摘要: 目的 探讨切应力与血管平滑肌细胞(VSMCs)对内皮细胞(ECs)增殖功能的影响及其一些分子机制。方法 应用平行平板流动腔系统对单独培养的 ECs 以及与 VSMCs 联合培养的 ECs 施加 15 dyn/cm^2 ($1 \text{ dyn} = 10^{-5} \text{ N}$) 的正常切应力; Western blot 技术检测反映细胞增殖能力的分子—增殖细胞核抗原(PCNA)的表达及细胞内信号转导分子 Akt 的磷酸化水平。静态条件下,以单独培养 ECs 为对照组,将 ECs 与 VSMCs 隔开培养,并应用 TGF β 1 封闭性抗体,观察 TGF β 1 在 VSMCs 诱导 ECs 增殖中的作用。结果 正常切应力抑制了 ECs 增殖及 p-Akt 表达,VSMCs 在与 ECs 联合培养及隔开培养时均明显促进 ECs 增殖及 p-Akt 表达。正常切应力部分逆转了联合培养 VSMCs 诱导的 ECs 增殖和 p-Akt 表达,而 TGF β 1 封闭性抗体能够拮抗隔开培养 VSMCs 诱导的 ECs 增殖和 p-Akt 表达。结论 正常切应力可视为血管的保护因子,抑制 ECs 增殖;VSMCs 通过旁分泌作用诱导了 ECs 增殖;TGF β 1 及 PI3/Akt 信号分子参与了其调节过程。

关键词: 切应力; 血管平滑肌细胞; 血管内皮细胞; 细胞增殖; 细胞培养

中图分类号: R318.01 **文献标志码:** A

Shear stress and vascular smooth muscle cells modulate the proliferation of endothelial cells via TGF β 1 and p-Akt pathways

JIANG Xiao-hua, YAO Qing-ping, JIANG Jun, JI Su-ying, QI Ying-xin, JIANG Zong-lai (Institute of Mechanobiology and Medical Engineering, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract; Objective To investigate the effects of shear stress and vascular smooth muscle cells (VSMCs) on the proliferation of endothelial cells (ECs) and the molecular mechanism involved in. **Method** Using parallel-plate flow chamber system, normal shear stress of 15 dyn/cm^2 ($1 \text{ dyn} = 10^{-5} \text{ N}$) was applied to ECs cultured singly and co-cultured with VSMCs respectively. Then, the expression of PCNA, a molecule representing cell proliferation ability, and phosphorylation of Akt were analyzed by Western blotting in order to investigate the roles of shear stress and VSMCs in EC proliferation. Under the static condition, the expressions of PCNA and p-Akt were analyzed in ECs co-cultured with VSMCs with and without physical contact. And then TGF β 1 neutralizing antibody was employed to demonstrate the contribution of TGF β 1 in VSMCs induced EC proliferation. **Results** Normal shear stress decreased EC proliferation and Akt phosphorylation. VSMCs increased EC proliferation and Akt phosphorylation in both co-culture conditions with and without physical contact. Normal shear stress partly reversed the increase of proliferation and Akt phosphorylation in ECs with physical contact to VSMCs, and TGF β 1 neutralizing antibody exerted the similar effects in ECs without physical contact to VSMCs. **Conclusions** Normal shear stress is a protective factor with its inhibitory effect on EC proliferation. VSMCs induced EC proliferation via TGF β 1 and p-Akt pathways by paracrine model.

收稿日期:2010-06-24; 修回日期:2010-08-14

基金项目:国家自然科学基金资助项目(10702043,10732070);综合性新药研究开发技术大平台资助项目(2009ZX09301-007)。

作者简介:姜晓华(1984-),女,硕士研究生,研究方向:血管力学生物学。

通讯作者:齐颖新, Tel: (021) 34204863; E-mail: qiyx@sjtu.edu.cn。

Key words : Shear stress; Vascular smooth muscle cells; Endothelial cells; Cell proliferation; Cell culture

血管重建是高血压、动脉粥样硬化、血管成形术后狭窄等疾病的基本病理表现,包括血管壁细胞的迁移、增殖、凋亡以及细胞外基质成分合成、降解及重新排列等过程^[1]。研究表明,血管重建的发生、发展与血管内皮细胞(endothelial cells, ECs)结构和功能的改变有密切关系^[2],其中,ECs 增殖功能异常是动脉粥样硬化血管重建的重要因素之一^[3-4]。研究 ECs 增殖功能变化及其分子机制对于认识动脉粥样硬化等疾病发病机理和疾病防治有重要意义。

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)和 ECs 是血管壁的主要细胞成分。在体情况下,位于血管壁内侧单层排列的 ECs 其管腔面与血流直接接触,而其基底面通过血管内弹力膜上的孔隙与 VSMCs 直接相邻。由于其特殊的生理结构位置,ECs 一方面受到血流动力学因素,尤其是切应力的作用,另一方面,又受到 VSMCs 合成分泌的多种生长因子和炎性介质等血管活性物质的影响^[5]。研究发现,ECs 可以感受不同形式的机械作用力,通过改变生长速度、形态和细胞外基质蛋白的分泌等响应力学信号刺激^[6],生理范围内的切应力刺激使 ECs 的增殖和凋亡处于动态平衡,以维持血管形态、结构和功能的稳定^[7];异常切应力刺激可打破此平衡,导致血管壁结构和功能的改变^[7-8]。同时,ECs 可以响应 VSMCs 分泌的各种信号分子、细胞因子的作用,从而发生一系列细胞内信号途径的激活,引起 ECs 增殖、分化、凋亡等功能的改变^[9-11]。然而,在切应力和 VSMCs 共同作用下,ECs 增殖功能的变化及其力学生物学机制尚不十分清楚。

本文拟应用 ECs 与 VSMCs 联合培养的平行平板流动腔系统^[5],模拟在体 ECs 与 VSMCs 间的内在联系,并精确地控制对 ECs 施加的应力条件,观察切应力和 VSMCs 对 ECs 增殖功能的影响及其相关的信号通路,为探讨血管重建的力学生物学机制提供一些实验依据。

1 材料和方法

1.1 血管内皮细胞和平滑肌细胞培养及鉴定

采用酶消化法原代培养大鼠胸主动脉 ECs^[12]:

无菌条件下取 200 ~ 250 g 雄性 SD 大鼠胸主动脉。将血管纵行剪开,ECs 面向下平铺在覆有 I 型胶原酶(Worthington 公司,0.2%)的细胞培养皿内,37℃ 消化并轻轻拍打培养皿 30 min 后,加入 ECs 培养基[20% 胎牛血清(Giboco 公司)酸性成纤维细胞生长因子(aFGF, Sigma 公司),肝素(heparin, Sigma 公司),HEPES(Sigma 公司),胸腺嘧啶(Sigma 公司),青链霉素(BBI 公司)]终止消化,以 1 100 r/min 的速度离心 10 min,用 ECs 培养液约 3 mL 重悬细胞,均匀接种于细胞培养皿。平置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中内 24 h,待细胞贴壁后换液。以后隔天换液 1 次,以 2 ~ 4 代 ECs 用于本实验。用抗 vWF(von Willebrand Factor)抗体(1:200, Sigma 公司)对 ECs 胞质中 vWF 进行免疫细胞化学鉴定,阳性着色 95% 以上者用于实验。

采用组织贴块法原代培养大鼠胸主动脉 VSMCs^[13]:将上述消化 ECs 的大鼠胸主动脉小心擦拭,去除外膜后,反复剪切成碎块 1 mm³ 备用,加入少量含 VSMCs 培养液[10% 小牛血清(Giboco 公司),青链霉素(BBI 公司)],将组织块均匀接种至培养瓶中,加入 VSMCs 培养液,将有组织块的一面朝上置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中内。待 6 h 后,轻轻翻转培养瓶,使培养液浸润组织块,继续静置培养。大约 3 ~ 6 d 后可见细胞从组织块中爬出。以 4 ~ 7 代 VSMCs 用于本实验。用抗 α -肌动蛋白抗体(1:200, Sigma 公司)对 VSMCs 进行免疫细胞化学鉴定,阳性着色 95% 以上者用于实验。

1.2 实验分组

本文实验共分 5 组:

(1) ECs 单独静止培养(EC/O)(见图 1 A):将 2×10^5 个 ECs 种植于联合培养杯聚乙烯(PET)膜的外底面,6 h 后细胞贴壁完全,翻转培养杯放入空白无菌 6 孔培养板内,加入 ECs 培养液继续培养;

(2) ECs 与 VSMCs 隔开培养静止组(EC//VSMC)(见图 1B):按(1)的方法种植 ECs 于 PET 膜外底面,同时将 2×10^5 个 VSMCs 种植于 6 孔培养板内,6 h 细胞贴壁完全后将联合培养杯放入种植有 VSMCs 的 6 孔培养板中,继续培养;

(3) ECs 与 VSMCs 联合培养静止组 (EC/VSMC) (见图 1C):按(1)的方法种植 ECs 于 PET 膜外底面,6 h 后将膜翻转放入空白 6 孔培养板中,加入 ECs 培养液,将 2×10^5 个 VSMCs 种植于 PET 膜内底面,静置培养;

(4) ECs 单独受力组 (EC/O + shear stress) (见图 1D):按(1)的方法种植 ECs 于 PET 膜外底面,6 h 细胞完全贴壁后,置于平行平板流动腔系统施加 15 dyn/cm^2 ($1 \text{ dyn} = 10^{-5} \text{ N}$) 正常层流切应力;

(5) ECs 与 VSMCs 联合培养受力组 (EC/VSMC + shear stress) (见图 1E):按(3)的方法分别种植 ECs 与 VSMCs 后,置于平行平板流动腔系统施加 15 dyn/cm^2 正常层流切应力。

以上各实验组细胞,待细胞生长至 80% 融合后,吸出培养液,在 ECs 侧加入含 1% 胎牛血清的 M199 (Giboco 公司) 培养液, VSMCs 侧加入含 1% 小牛血清的 DMEM (Giboco 公司) 培养液同步化 12 h,用于实验。

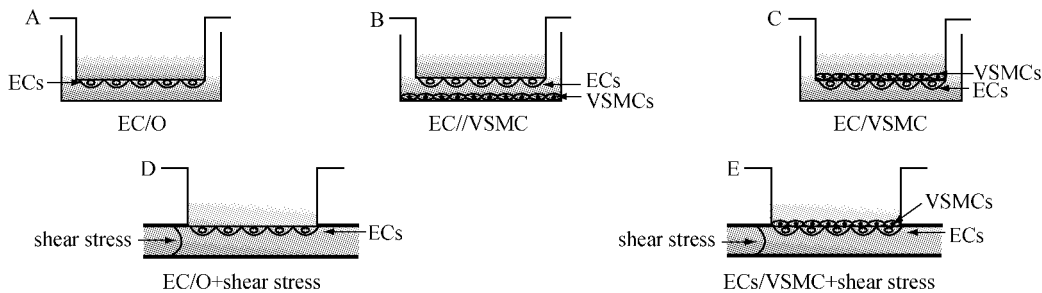


图 1 实验组与联合培养平行平板流动腔示意图

Fig. 1 Schematic diagram of experiment group and parallel-plate coculture flow chamber model

1.3 封闭性抗体实验

将 VSMCs 种植于六孔培养板 6 h 贴壁后,使用 1% 小牛血清 DMEM 培养液同步化细胞 12 h,加入 TGF β 1 封闭性抗体 (R&D 公司, $0.6 \mu\text{g/mL}$) 孵育 30 min,之后放入底面种植 ECs 的联合培养杯,置于 37°C , 5% CO_2 培养箱中内培养 12 h。

1.4 蛋白免疫印记实验 (Western blot)

提取各组 ECs 总蛋白,用 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,蛋白上样量 $30 \mu\text{g}$ 。5% 的脱脂奶粉封闭 1 h,抗 p-Akt (Cell Signal Technology, 1: 500), t-Akt (Cell Signal Technology, 1: 500), 增殖细胞核抗原 PCNA (反映细胞增殖能力的分子,中杉金桥生物公司, 1: 500), GAPDH (Santa Cruz, 1: 500) 4°C 孵育过夜,碱性磷酸酶标记二抗 (中杉金桥生物公司, 1: 1000) 室温孵育 2 h,用 NBT/BCIP (KPL 公司) 底物显色。扫描后使用 BIO-RAD 公司一维分析软件 Quantity One 进行图像灰度分析。

1.5 统计学分析

实验数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm sd$) 表示,组间比较采用两样本均数 t 检验,以 $P < 0.05$ 作为差异显著的临界值。

2 结果

2.1 正常切应力抑制内皮细胞增殖

与静态 ECs 单独培养相比较,单独培养的 ECs 施加正常切应力 (15 dyn/cm^2) 12 h 后,细胞的 PCNA 表达明显降低 ($P < 0.05$),细胞内信号转导分子 Akt 的磷酸化水平也明显降低 ($P < 0.05$, 见图 2)。结果提示,正常大小的切应力可抑制 ECs 增殖,以维持血管的稳定。

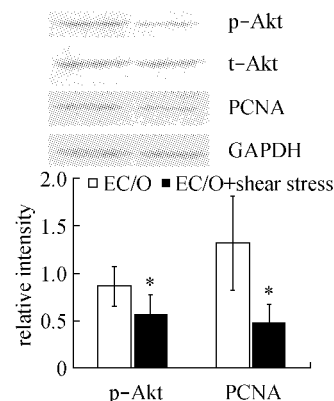


图 2 正常切应力抑制 ECs 的 Akt 磷酸化及 PCNA 表达

Fig. 2 Normal shear stress repressed phosphorylation of Akt and expression of PCNA in ECs

2.2 切应力与血管平滑肌细胞联合作用对内皮细胞增殖的影响

与静态单独培养 ECs 相比, VSMCs 联合培养组 ECs 的 p-Akt 及 PCNA 表达均明显升高 ($P < 0.05$) (见图 3)。对与 VSMCs 联合培养的 ECs 施加正常切应力 (15 dyn/cm^2) 后, ECs 的 p-Akt 及 PCNA 表达均较联合培养静止组降低, 但差异无显著性 ($P > 0.05$, 见图 3)。结果提示, VSMCs 可诱导 ECs 增殖, 而正常切应力能够部分逆转 VSMCs 诱导的 ECs 增殖。

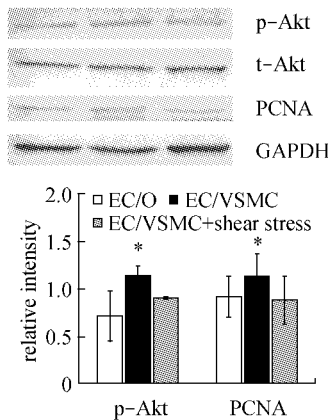


图3 正常切应力与 VSMCs 对 ECs 的 Akt 磷酸化及 PCNA 表达的影响

Fig.3 VSMCs induced phosphorylation of Akt and expression of PCNA in ECs while NSS reversed these effects

2.3 细胞直接接触及旁分泌在血管平滑肌细胞诱导内皮细胞增殖中的作用

与静态 ECs 单独培养相比, VSMCs 在联合培养和隔开培养状态下均显著促进 ECs 的 PCNA 表达及 Akt 磷酸化 ($P < 0.05$, 见图 4)。隔开培养 VSMCs 对 ECs PCNA 表达的增强作用与直接接触组相比略下降, 但差异无显著性 ($P > 0.05$, 见图 4)。结果表明, 直接接触和旁分泌在 VSMCs 诱导 ECs 增殖过程中均起重要作用。

2.4 TGFβ1 在血管平滑肌细胞诱导内皮细胞增殖中的作用

在 ECs 与 VSMCs 隔开培养组, 用 TGFβ1 封闭性抗体中和 VSMCs 合成分泌的 TGFβ1 的生物活性。结果显示, 与静态隔开培养组相比, TGFβ1 封闭性抗体显著下调了隔开培养 VSMCs 诱导的 ECs p-Akt 及 PCNA 表达 ($P < 0.05$, 见图 5)。结果提示,

VSMCs 合成分泌的 TGFβ1 在 VSMCs 诱导 ECs 增殖中发挥作用。

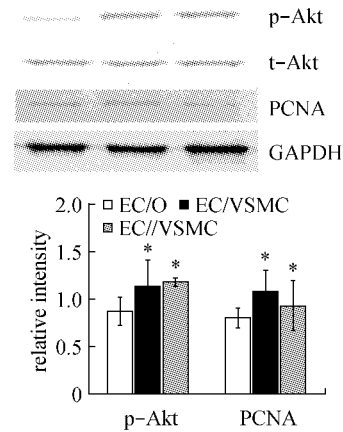


图4 VSMCs 促进 ECs 的 Akt 磷酸化及 PCNA 表达

Fig.4 VSMCs induced phosphorylation of Akt and expression of PCNA in ECs

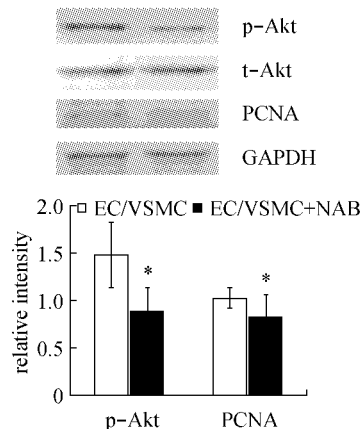


图5 TGFβ1 封闭性抗体抑制 VSMCs 诱导的 ECs Akt 磷酸化及 PCNA 表达

Fig.5 Neutralized antibody of TGFβ1 repressed the phosphorylation of Akt and expression of PCNA in ECs which were induced by VSMCs

3 讨论

ECs 异常增殖在血管的生理病理活动中扮演着重要角色。心血管疾病如动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄等血管重建过程均出现 ECs 的异常增殖。为探讨在切应力和 VSMCs 共同作用下, ECs 增殖功能的变化及其力学生物学机制, 本实验应用了 ECs 和 VSMCs 联合培养模型。该模型将 ECs 和 VSMCs 分别种植于联合培养杯的内、外两侧。这种

培养杯的底面为PET膜,ECs与VSMCs通过PET膜分隔,PET膜厚10 μm ,膜上有孔径为0.4 μm 的微孔(1.6×10^6 万个/ cm^2),VSMCs与ECs可通过小孔直接接触,膜两侧的培养液也可以通过这些微孔互相沟通。ECs和VSMCs隔开培养则排除了两细胞的直接接触,保留了两侧培养液的沟通,即两细胞仍可通过旁分泌途径相互作用。结果显示,直接接触和隔开培养情况下VSMCs均显著诱导ECs内反应细胞增殖能力的分子标志—PCNA表达,并激活细胞内信号转导分子Akt,且直接接触条件下ECs增殖能力较隔开培养条件下升高更为明显。结果提示,VSMCs的直接接触和旁分泌均能够引起ECs增殖功能的异常增高。

以往研究结果显示,生理范围内的切应力刺激抑制ECs的增殖和凋亡,以维持血管结构的稳定^[7]。本文结果显示,正常层流切应力能够抑制ECs增殖和Akt磷酸化。切应力与VSMCs两种因素对ECs的联合作用结果显示,正常切应力能够部分逆转VSMCs诱导的ECs增殖和p-Akt表达。上述结果提示,正常切应力对于ECs而言是一种保护因子。

Opitz等^[14]研究结果显示,体外培养4~7代的VSMCs去分化为合成表型,分泌大量生长因子和炎症介质。VSMCs可能通过上述生长因子的释放激活ECs内p-Akt信号通路从而诱导了ECs的增殖。近年来,人们开始关注TGF β 家族在心血管系统中的功能和重要作用^[15]。Ahamed等^[16]研究证实,血流切应力能够激活血小板释放入血液中的TGF β 1分子。有研究表明,切应力能够诱导ECs分泌TGF β 1^[17]。也有研究发现,机械张应变诱导ECs分泌TGF β 1,诱导细胞内MAPK和smad等多种信号通路信号分子的磷酸化,并通过TGF β 1的旁分泌反馈调节VSMCs增殖功能,从而参与调控血管重建过程^[18]。因此,TGF β 1是研究切应力对ECs信号通路激活机制的重要信号分子。为了检测TGF β 1在VSMCs诱导的ECs增殖及p-Akt信号通路激活过程中的作用,本文使用TGF β 1封闭性抗体中和隔开培养条件下VSMCs合成、分泌的TGF β 1,阻断其生物活性。结果显示,TGF β 1封闭性抗体下调了隔开培养的VSMCs诱导的ECs增殖和Akt磷酸化。结果提示,VSMCs合成、释放的TGF β 1通过旁分泌作用

诱导了ECs的增殖和细胞内Akt信号通路的激活。由于隔开培养情况下,VSMCs与ECs有一定距离,TGF β 1浓度可能低于直接接触联合培养组TGF β 1的浓度,这也解释了隔开培养组ECs的PCNA表达水平低于直接接触联合培养组的原因。

综上所述,本文的结果表明,正常切应力抑制ECs增殖,对ECs起保护作用;VSMCs通过直接接触和旁分泌作用诱导ECs增殖,而正常切应力能够抑制VSMCs诱导的ECs增殖;VSMCs通过旁分泌TGF β 1,激活ECs的Akt信号转导通路,参与了ECs增殖的调控。

参考文献:

- [1] 姜宗来. 心血管力学生物学研究的新进展[J]. 医用生物力学, 2006, 21(004): 251-253.
- [2] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. *Nature*, 1993, 362(6423): 801-809.
- [3] Traub O, Berk BC, Lamina shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18(5): 677-685.
- [4] Anderson TJ, Gerhard MD, Meredith IT, et al. Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis [J]. *Am J Cardiol*, 1995, 75(6): 71B-74B.
- [5] 丛兴忠,姜宗来,李玉泉,等. 用于内皮细胞与平滑肌细胞联合培养的流动腔系统[J]. 医用生物力学, 2001, 16(1): 1-5.
- [6] Chien S, Li S, Shyy YJ, et al. Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells [J]. *Hypertension*, 1998, 31(1 Pt 2): 162-169.
- [7] Cunningham KS, Gotlieb AI. The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Lab Invest*, 2005, 85(1): 9-23.
- [8] Li YS, Haga JH, Chien S. Molecular basis of the effects of shear stress on vascular endothelial cells [J]. *J Biomech*, 2005, 38(10): 1949-1971.
- [9] Nguyen LL, D'Amore PA. Cellular interactions in vascular growth and differentiation [J]. *International Review of Cytology—A Survey of Cell Biology*, 2001, 204: 1-48.
- [10] Darland DC, D'Amore PA. Cell-cell interactions in vascular development [J]. *Current Topics in Developmental Biology*, 2001, 52: 107-149.
- [11] Chiu JJ, Chen L J, Lee CI, et al. Mechanisms of induction of endothelial cell E-selectin expression by smooth muscle

(下转第351页)