

· 基础研究 ·

凝血酶敏感蛋白 1 对体外培养大鼠肺动脉平滑肌细胞的影响*

杨艳娟¹, 杨桂兰¹, 郑西卫¹, 侯 嘉¹, 程德云²

(1. 宁夏医科大学总医院呼吸科, 银川 750004; 2. 四川大学华西医院呼吸科, 成都 610041)

摘要:目的 了解凝血酶敏感蛋白 1(TSP-1)对体外培养的大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)的影响。方法 体外培养大鼠 PASMCs, 加入不同浓度(10^{-12} 、 10^{-11} 和 10^{-10} mol/L) TSP-1 处理 12、24、48 h, 采用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑盐(MTT)法检测细胞增殖, 流式细胞术(FCM)检测细胞周期。结果 TSP-1 刺激后, MTT 法实验结果显示 TSP-1 显著促进大鼠 PASMCs 增殖, 此作用呈浓度和时间依赖性。FCM 分析显示 TSP-1 使 S 期细胞比例增加。TSP-1 处理 12 h 后, S 期细胞比例增加, 24 h 时轻微下降, 48 h 时达高峰。结论 TSP-1 呈浓度和时间依赖性地促进大鼠 PASMCs 增殖。

关键词:凝血酶敏感蛋白 1; 肺动脉平滑肌细胞; 细胞增殖

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.35.024

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)35-4294-03

Effect of thrombospondin-1 on proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells*

Yang Yanjuan¹, Yang Guilan¹, Zheng Xiwei¹, Hou Jia¹, Cheng Deyun²

(1. Department of Respiratory Disease, Affiliated Hospital of Ningxia Medical College, Yinchuan, Ningxia 750004, China;

2. Department of Respiration Diseases, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of thrombospondin 1(TSP-1) on the cell proliferation of cultured rat pulmonary artery smooth cell(PASMCs) in vitro. Methods Rat PASMCs were cultured in vitro, and treated with different concentrations (10^{-12} 、 10^{-11} 、 10^{-10} mol/L) of TSP-1 for 12, 24, 48 h. The cell proliferation was quantified by MTT assay. The cell cycle of PASMCs was measured by flow cytometric(FCM) analysis. Results MTT assay showed that TSP-1 promoted the proliferation of PASMCs significantly, and the effect was concentration-dependent and time-dependent. FCM analysis indicated that TSP-1 increased the percentage of S phase. The percentage of S phase of PASMCs were increased after treated with thrombospondin-1 for 12 h, slight down after 24 h, while reached a maximal level at 48 h. Conclusion The TSP-1 promotes rat PASMCs proliferation in a concentration-dependent and time-dependent manner.

Key words: thrombospondin 1; pulmonary artery smooth muscle cell; cell proliferation

凝血酶敏感蛋白 1(thrombospondin 1, TSP-1)是一种相对分子质量为 450×10^3 的糖蛋白, 主要由血小板、肿瘤细胞、内皮细胞等分泌, 存在于血浆和细胞外基质中, 具有调节血小板聚集、细胞黏附、运动、生长的功能^[1-2]。本研究前期实验发现低氧性肺动脉高压大鼠血浆 TSP-1 浓度和肺组织 TSP-1 mRNA 及蛋白表达明显增加, 慢性缺氧可导致肺动脉平滑肌细胞 TSP-1 表达增加^[3], 但 TSP-1 能否促进肺动脉平滑肌细胞增殖目前还不十分清楚。为研究此因子在这方面的作用, 本研究离体培养大鼠肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth cell, PASMCs), 用 TSP-1 刺激观察其对 PASMCs 增殖的影响。

1 材料与与方法

1.1 实验动物 SD 大鼠新生鼠 2 只, 购于四川大学试验动物中心。

1.2 材料 CO₂ 细胞培养箱(Forma Scientific, 美国), 倒置显微镜(Olympus, 日本), 流式细胞仪(Becton Dickinson, 美国), 电热鼓风干燥箱(DHG-9240 型, 上海精宏实验设备有限公司), 微量移液器(Eppendorf, 德国), TSP-1(Sigma 公司), 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)、Trizol(Sigma 公司), 胎牛血清、DMEM 培养基、胰蛋

白酶(Gibco 公司)。0.25%胰蛋白酶溶液: 称取 50 mg 胰蛋白酶加入 20 mL 生理盐水, 混匀后经 0.2 μm 滤菌器过滤除菌, -20℃保存。5 mg/mL MTT: 0.5 g MTT, 用磷酸盐缓冲液(PBS)定容至 100 mL, 0.2 μm 滤菌器过滤除菌, 4℃避光保存。

1.3 方法

1.3.1 大鼠 PASMCs 培养 取 SD 大鼠新生鼠(4 d 以内), 碘伏常规消毒, 打开胸腔, 取下完整的心肺组织置于无菌的培养皿中; 分离、剪下肺动脉主干, 0.01 mol/L PBS 冲净血管内的血液, 用眼科剪纵行剪开肺动脉, 同时轻刮内膜面 3~5 次, 用预冷的含双抗的 D'-汉克斯(D'-Hanks)缓冲液漂洗 1 次。后剪切成 1.5 mm×1.5 mm 的小动脉片, 贴于明胶包被过的六孔板上, 放于 37℃, 5.0% CO₂, 95% 饱和湿度条件下微干润 2 h 后, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 新鲜培养基 1 mL, 放入 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 4 h 后补充培养基至 2 mL。3 d 后细胞可达一定密度, 换液 1 次。继续培养至 5 d, 形成细胞单层。8 d 后待细胞完全融合进行细胞传代并进行 α-SM-actin 抗体免疫组织化学鉴定, 胞体出现棕黄色为阳性。

1.3.2 MTT 法检测细胞增殖 以 1×10^{-10} 、 1×10^{-11} 、 1×10^{-12} mol/L 的 TSP-1 分别处理 PASMCs 12、24、48 h。用含

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30960142)。 作者简介: 杨艳娟(1973~), 博士, 副教授, 主要从事肺动脉高压的研究。

10%胎牛血清的 DMEM 新鲜培养基调整细胞悬液浓度为 2.5×10^4 /mL, 每种细胞分别均匀接种于 96 孔培养板中, 每孔 200 μ L, 常规培养 24 h; 按上述方法进行分组实验, 每组设 6 个重复孔。未做 TSP-1 处理的 PSMCs 作为对照组。37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 95% 饱和湿度条件下, 分别培养 12、24、48 h; 加 MTT (5 mg/mL) 每孔 20 μ L (加 MTT 前将前述培养基换为不含血清的 DMEM 培养基), 继续培养 4 h 后终止培养, 小心吸弃孔内上清液; 加每孔 DMSO 150 μ L, 均匀振荡 10 min 至结晶溶解, 比色, 在酶联免疫检测仪上测定 490 nm 波长处各孔吸光度值 A490, 记录实验结果。根据公式计算细胞生长抑制率 [细胞生长抑制率 = (1 - 实验组吸光度 A490 / 对照组平均吸光度 A490) \times 100%]。

1.3.3 FCM 检测细胞周期 以 1×10^{-10} 、 1×10^{-11} 、 1×10^{-12} mol/L 的 TSP-1 分别处理 PSMCs 12、24、48 h。0.25% 胰蛋白酶消化, 收集细胞, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 新鲜培养基调整细胞悬液浓度为 5×10^4 /mL, 分别均匀接种于 25 cm² 培养瓶中, 每瓶 5 mL, 常规培养; 未做 TSP-1 处理的 PSMCs 作为对照组。37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 95% 饱和湿度条件下, 分别培养 12、24、48 h 后, 用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化细胞; 收集于 15 mL 离心管, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用 0.01 mol/L PBS 溶液洗涤细胞 2 次; 用预冷的 70% 乙醇于 4 $^{\circ}$ C 固定 1 h, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用 0.01 mol/L PBS 溶液洗涤细胞 2 次, 加 1 mL 0.01 mol/L PBS 溶液重悬细胞, 另加入 RNAaseA 和碘化丙啶(propidium iodide, PI), 使其终浓度分别为 50 μ g/mL 和 100 μ g/mL, 4 $^{\circ}$ C 避光放置 30 min。上流式细胞仪进行检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行数据处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间差异比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 *q* 检验, 检验标准 $\alpha = 0.05$, 以 $P > 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 TSP-1 对细胞增殖的影响 在同一时间点, 随着 TSP-1 浓度增加, PSMCs 的 A 值逐渐增加, 除了 1×10^{-12} mol/L TSP-1 作用 12 h 组的 A 值与对照组对应时间点比较, 差异无统计学意义外, 其余各浓度与对应时间点比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。提示 TSP-1 可呈浓度依赖性促进 PSMCs 增殖。同一浓度 TSP-1 处理不同时间各组之间的比较显示: 同一浓度各时间点与对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 且随着刺激时间的延长, A 值增加更明显, 24 h 与 12 h 相比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 48 h 与 12 h 相比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 48 h 与 24 h 相比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示随着时间的延长, TSP-1 促进 PSMCs 增殖作用逐渐增加, 48 h 达到高峰, 见表 1。

2.2 TSP-1 在不同时间点、不同浓度对细胞周期的影响 12 h 时予 TSP-1 处理后, 大鼠 PSMCs 中 S 期细胞的比例明显增加, TSP-1 浓度为 1×10^{-10} mol/L 时 S 期细胞所占比例与对照组比较有明显增加 ($P < 0.01$), 但与 TSP-1 (1×10^{-11} mol/L) 相比无统计学差异 ($P > 0.05$)。24 h 时予 TSP-1 处理后, TSP-1 浓度为 1×10^{-12} mol/L 时的 S 期与对照组相比较虽有升高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 其余两个浓度 PSMCs 中 S 期细胞的比例呈浓度依赖性增加, 与对照组相比差异有显著意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 后两个浓度之间比较也均有明显差异

($P < 0.05$)。48 h 时 TSP-1 处理后, TSP-1 浓度为 1×10^{-12} mol/L 时的 S 期与对照组相比较即有明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 但随着浓度增加, 在 TSP-1 浓度为 10^{-12} mol/L 时的 S 期与 TSP-1 浓度为 1×10^{-11} mol/L 时 S 期相比虽有增加, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 而随后 TSP-1 浓度为 1×10^{-10} mol/L 时 S 期与对照组比较有显著差异 ($P < 0.01$), 与 TSP-1 浓度为 1×10^{-11} mol/L 时比较也有明显差异 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 1 不同浓度 TSP-1 在不同时间点对 PSMCs 增殖能力的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

TSP-1 浓度 (mmol/L)	12 h	24 h	48 h
0(对照组)	0.348 \pm 0.033	0.448 \pm 0.028	0.527 \pm 0.023
1×10^{-12}	0.366 \pm 0.028	0.481 \pm 0.030 ^a	0.559 \pm 0.028 ^a
1×10^{-11}	0.438 \pm 0.037 ^{bd}	0.525 \pm 0.014 ^{bc}	0.593 \pm 0.016 ^{bc}
1×10^{-10}	0.498 \pm 0.030 ^{bde}	0.575 \pm 0.016 ^{bde}	0.639 \pm 0.017 ^{bde}

^a: $P < 0.05$, 与 TSP-1 浓度为 0 mmol/L 同一时间点比较; ^b: $P < 0.01$, 与 TSP-1 浓度为 0 mmol/L 同一时间点比较; ^c: $P < 0.05$, 与 TSP-1 浓度为 1×10^{-12} mmol/L 同一时间点比较; ^d: $P < 0.01$, 与 TSP-1 浓度为 1×10^{-12} mmol/L 同一时间点比较; ^e: $P < 0.05$, 与 TSP-1 浓度为 1×10^{-11} mmol/L 同一时间点比较。

表 2 TSP-1 对在不同时间点 PSMCs S 期的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

TSP-1 浓度 (mmol/L)	12 h	24 h	48 h
0(对照组)	13.482 \pm 0.223	14.448 \pm 0.224	15.922 \pm 0.303
1×10^{-12}	15.266 \pm 0.312 ^b	14.842 \pm 0.230	17.051 \pm 0.227 ^{8b}
1×10^{-11}	16.028 \pm 0.337 ^{bc}	15.247 \pm 0.314 ^{ac}	17.573 \pm 0.316 ^b
1×10^{-10}	16.368 \pm 0.410 ^{bc}	16.325 \pm 0.412 ^{bde}	18.289 \pm 0.338 ^{bde}

^a: $P < 0.05$, 与同一时间点 TSP-1 浓度为 0 mmol/L 比较; ^b: $P < 0.01$, 与同一时间点 TSP-1 浓度为 0 mmol/L 比较; ^c: $P < 0.05$, 与同一时间点 TSP-1 浓度为 1×10^{-12} mmol/L 比较; ^d: $P < 0.01$, 与同一时间点 TSP-1 浓度为 1×10^{-12} mmol/L 比较; ^e: $P < 0.05$, 与同一时间点 TSP-1 浓度为 1×10^{-11} mmol/L 比较。

3 讨 论

TSP-1 具有调节血小板聚集、细胞黏附、运动及生长的功能。TSP-1 可由多种炎症细胞如单核/巨噬细胞、中性粒细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、成纤维细胞等表达, 以旁分泌和自分泌的形式分泌^[4]。同时 TSP-1 也是一种与血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 受损后趋化相关的糖蛋白^[5], 有文献表明 TSP-1 在 VSMCs 的增殖和活化中也起着重要作用, TSP-1 与受体结合通过细胞外信号调节蛋白激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ErK) 和核糖体 S6 激酶 (reperfusion salvage kinase, RSK), 经血小板源性生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 诱导促进 VSMCs 的增殖^[6-10]。另有文献发现, NO 可抑制 TSP-1、PDGF 及纤维连接素介导的 VSMCs 增殖和迁移^[10-11]。TSP-1 在动脉损伤后可诱导 VSMC 迁移。它通过上调 VSMCs 透明质酸 (hyaluronic acid, HyA) 诱导基因实现增加迁移的作用, 而 HyA 也可以诱

导 VSMCs 的迁移作用,并且这种作用是通过 CD44 受体依赖方式进行的。抑制 CD44 可减少 TSP-1 和 HyA 诱导的迁移,而 TSP-1 和 HyA 可激活 EGFR,所以 TSP-1 和 HyA 诱导的迁移可能是通过同一信号通路实现,其共同连接点可能是通过 EGFR/CD44 受体通路^[12]。

本实验采用 MTT 法检测结果与既往文献的研究结论一致^[13-14],TSP-1 在 $1 \times 10^{-12} \sim 1 \times 10^{-10}$ mol/L 的浓度范围内诱导大鼠 PSMCs 增殖,而且此作用随着 TSP-1 浓度的增加,呈浓度依赖性。另外 MTT 法亦发现,在一定的时间范围内(12~48 h),随着作用时间的延长,TSP-1 促进 PSMCs 增殖作用亦逐渐增加,这说明 TSP-1 刺激 PSMCs 的增殖呈现一定的时间依赖性。细胞周期中 G1 期为生长停滞期,如果 G1 期比例增大表明细胞分裂减慢,抑制生长,反之,比例减小,分裂加快,促进生长;S 期是 DNA 合成期,G2 期为 DNA 合成完成期,两个期的比例增加表明分裂加快,促进生长,反之,比例减小,分裂减慢,抑制生长。通过检测发现在同一时间点上,不同浓度的 TSP-1 可促进大鼠 PSMCs S 期比例增加,而且随着浓度的递增,S 期比例明显增加;同样,在相同浓度的 TSP-1 处理大鼠 PSMCs,随着处理时间的延长,在低浓度(1×10^{-12} mol/L)S 期比例逐渐增加,到 48 h 达到高峰,而后 2 个浓度(1×10^{-11} mol/L 和 1×10^{-10} mol/L)S 期在 12 h 先增高,24 h 略下降,48 h 又重新增高。为何出现这样的变化目前还不是很清楚,考虑是内源性一过性 TSP-1 消耗所致,而增加 TSP-1 浓度后其 S 期比例亦明显增加。当然与 MMT 法相比,FCM 结论也是 TSP-1 诱导 PSMCs 增殖是浓度依赖性的,同时呈现一定的时间依赖性(24~48 h)。

综上所述,本研究认为 TSP-1 通过促进 S 期 DNA 合成来促进 PSMCs 细胞增殖,下一步本研究还将进行体外培养肺成纤维细胞,观察 TSP-1 是否也能促进肺成纤维细胞增殖来进一步明确 TSP-1 在低氧性肺动脉高压肺血管重建的作用。

参考文献:

[1] Zaslavsky A, Baek KH, Lynch RC, et al. Platelet-derived thrombospondin-1 is a critical negative regulator and potential biomarker of angiogenesis [J]. *Blood*, 2011, 115 (22):4605-4613.

[2] Carlson CB, Lawler J, Mosher DF, et al. Thrombospondins: from structure to therapeutics: structures of thrombospondins [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(5):672-686.

[3] 杨艳娟,程德云,郑西卫,等.低氧性肺动脉高压大鼠肺内凝血酶敏感蛋白-1 的表达 [J]. *四川大学学报:医学版*, 2012, 43(1):19-23.

[4] Bige N, Shweke N, Benhassine S, et al. Thrombospondin-1 plays a profibrotic and pro-inflammatory role during ure-

teric obstruction [J]. *Kidney Int*, 2012, 81 (12): 1226 - 1238.

[5] Willis AI, Sadowitz B, Fuse S, et al. Thrombospondin 1, fibronectin, and vitronectin are differentially dependent upon RAS, ERK1/2, and p38 for induction of vascular smooth muscle cell chemotaxis [J]. *Vasc Endovascular Surg*, 2011, 45(1):55-62.

[6] Isenberg JS, Ridnour LA, Perruccio EM, et al. Thrombospondin-1 inhibits endothelial cell responses to nitric oxide in a cGMP-dependent manner [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(37):13141-13146.

[7] Seymour K, Han X, Sadowitz B, et al. Differential effect of nitric oxide on thrombospondin-1-, PDGF- and fibronectin-induced migration of vascular smooth muscle cells [J]. *Am J Surg*, 2010, 200(5):615-619.

[8] Xiao L, Du Y, Shen Y, et al. TGF-beta 1 induced fibroblast proliferation is mediated by the FGF-2/ERK pathway [J]. *Front Biosci*, 2012(17):2667-2674.

[9] Hallgren O, Rolandsson S, Andersson-Sjöland A, et al. Enhanced ROCK1 dependent contractility in fibroblast from chronic obstructive pulmonary disease patients [J]. *J Transl Med*, 2012(10):171.

[10] Stein JJ, Seymour KA, Maier KG, et al. The effects of nicotine on vascular smooth muscle cell chemotaxis induced by thrombospondin-1 and fibronectin [J]. *Am J Surg*, 2011, 202(5):545-548.

[11] Van Ly D, Burgess JK, Brock TG, et al. Prostaglandins but not leukotrienes alter extracellular matrix protein deposition and cytokine release in primary human airway smooth muscle cells and fibroblasts [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 303(3):L239-250.

[12] Maier KG, Sadowitz B, Cullen S, et al. Thrombospondin-1-induced vascular smooth muscle cell migration is dependent on the hyaluronic acid receptor CD44 [J]. *Am J Surg*, 2009, 198(5):664-669.

[13] Fuse S, Esemuede N, Yamaguchi M, et al. The role of G proteins in thrombospondin-1-induced vascular smooth muscle cell migration [J]. *Surgery*, 2008, 144(1):86-92.

[14] Seymour KA, Sadowitz B, Stein JJ, et al. Vascular smooth muscle cell migration induced by domains of thrombospondin-1 is differentially regulated [J]. *Am J Surg*, 2011, 202(5):553-557.

(收稿日期:2013-09-05 修回日期:2013-10-07)

欢迎投稿

欢迎订阅