

【基础研究】

血管生成^[3]。此外,松弛素还可以引起前列腺癌^[4]、肌瘤细胞^[5]、髓单核细胞^[6]的增殖。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell,VSMC)过度增殖是动脉粥样硬化斑块形成和血管成型术后再狭窄等心血管疾病的共同病理特征,而 VSMC 表型转化是其增殖和迁移的生物学基础^[7]。抑制 VSMC 过度增殖的关键分子成为治疗血管再狭窄和动脉粥样硬化等疾病的重要策略之一。目前松弛素对 VSMC 增殖效应的报道较少,本研究旨在探讨松弛素对 VSMC 增殖的效应及机制,为治疗血管再狭窄和动脉粥样硬化等疾病提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 人 VSMC 系(美国 ATCC 公司),人 H2 型松弛素购自美国 phoenixbiotech 公司,细胞计数试剂盒(cell counting kit-8,CCK-8)购自上海碧云天生物技术有限公司南通分公司,5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxy uridine,EdU)细胞增殖试剂盒购自广州市锐博生物科技有限公司(Apollo[®] 488),氚标记胸腺嘧啶核苷(tritiated thymidine,³H-TdR)购自中国科学院北京原子能研究所(3.7×10^4 Bq · L⁻¹),DMEM/F12(Dulbecco modified Eagle medium/ Ham's F12/F-12 Nutrient Mixture)培养基购自美国 Gibco 公司,青霉素、链霉素和二甲基亚砜(dimethyl sulphoxide,DMSO)均购于美国 Sigma 公司,增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)兔多克隆抗体、骨桥蛋白(osteopontin,OPN)小鼠单克隆抗体、细胞周期蛋白 D1 小鼠单克隆抗体、细胞周期蛋白 E 小鼠单克隆抗体、P27 小鼠兔多克隆抗体和磷酸化的组蛋白 3(phosphorylated-histone 3,P-H3)兔多克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司,Akt(serine/threonine)兔多克隆抗体及其磷酸化抗体、细胞外调节蛋白激酶 1/2(extracellular regulated protein kinases 1/2,ERK1/2)兔多克隆抗体及其磷酸化抗体和内参磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase,GAPDH)兔多克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,核转录因子- κ B p65(nuclear transcription factors kappa B p65,NF- κ B p65)兔多克隆抗体、 α -平滑肌肌动蛋白(alpha smooth muscle actin, α -SMA)兔多克隆抗体和平滑肌肌动蛋白-22 α (smooth muscle actin 22 alpha,SM22 α)兔多克隆抗体购自美国 Proteintech 公司。

1.2 VSMC 培养 采用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养人 VSMC,37 ℃,体积分数 5% CO₂ 条件下培养,每 2 d 换 1 次液,待细胞生长至 70% ~ 80% 的密度时,质量分数 0.25% 胰蛋白

酶消化,按 1:3 或 1:4 进行传代,取对数生长期细胞用于实验^[8]。

1.3 CCK-8 检测 VSMC 增殖 取对数生长期的 VSMC 经胰蛋白酶消化后,计数并调整细胞浓度为 2×10^7 L⁻¹,接种到 96 孔板,每孔 100 μ L,培养 24 h 后更换无血清的 DMEM/F12 培养基培养 24 h,并给予不同浓度的 H2 型松弛素(10^{-9} mol · L⁻¹、 10^{-8} mol · L⁻¹、 10^{-7} mol · L⁻¹、 10^{-6} mol · L⁻¹、 10^{-5} mol · L⁻¹)刺激 24 h,同时采用 10^{-6} mol · L⁻¹ 的 H2 型松弛素分别刺激 6、12、24 h 后,每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液,置于细胞培养箱 2 h,酶标仪 450 nm 处测定每孔的吸光度值(A_{450}),每组重复 6 次^[9]。

1.4 ³H-TdR 掺入实验 取对数生长期的 VSMC 经胰蛋白酶消化后,计数并调整细胞浓度为 2×10^7 L⁻¹,接种到 96 孔板,每孔 100 μ L,正常培养 24 h 后更换新鲜的含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 高糖培养基,待细胞生长至 80% 融合时,更换无血清的培养基饥饿 24 h,使细胞同步化 G₀ 期,对照组给予无菌的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)处理,实验组给予 10^{-6} mol · L⁻¹ 的 H2 型松弛素,加入 ³H-TdR(3.7×10^7 Bq · L⁻¹),继续孵育 24 h,弃去培养液,胰蛋白酶消化细胞,PBS 洗涤,体积分数 10% 三氯乙酸固定细胞,无水乙醇脱水、脱色,收集细胞置于液闪杯中,加入 5 mL 的闪烁液,液体闪烁计数仪测定放射强度。

1.5 EdU 掺入实验 取对数生长期的 VSMC 经胰蛋白酶消化后,计数并调整细胞浓度为 2×10^7 L⁻¹,接种到 96 孔板,每孔 100 μ L,培养 24 h 后更换无血清的 DMEM/F12 培养基培养 24 h,对照组给予无菌的 PBS 处理,实验组给予 10^{-6} mol · L⁻¹ 的 H2 型松弛素,培养 24 h 后,每孔加入 100 μ L 的 50 μ mol · L⁻¹ 的 EdU,孵育 2 h,弃去培养基,PBS 清洗细胞 2 次,每次 5 min,40 g · L⁻¹ 多聚甲醛室温固定 30 min,每孔加入 2 g · L⁻¹ 甘氨酸 100 μ L,脱色摇床孵育 5 min 后,弃甘氨酸溶液,PBS 清洗细胞 2 次,每次 5 min,每孔加入 100 μ L 渗透剂质量分数 0.5% TritonX-100 的 PBS,脱色摇床孵育 10 min;PBS 清洗 2 次,每次 5 min。每孔加入 100 μ L 的 1 × Apollo[®] 染色反应液,PBS 清洗 2 次,每次 5 min。每孔加入 100 μ L 1 × Hoechst 33342 反应液,避光、室温、脱色摇床孵育 30 min 后,弃染色反应液;PBS 清洗 2 次,每次 5 min,荧光显微镜下拍照,每孔随机 3 个视野,每组 6 个孔,计算处于 S 期细胞的百分比。

1.6 免疫印迹法检测细胞蛋白的表达 采用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,冰上裂解 30 min,4 ℃ 低温离心机 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,收集上清液,双

辛丁酸法测定细胞蛋白,加入适量 $5 \times$ 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白上样缓冲液, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 5 min 使蛋白充分变性保存备用,用微量加样器将等量的蛋白加入到上样孔中,经 SDS-PAGE 电泳分离蛋白后,将蛋白电转到聚偏二氟乙烯膜上, $50\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱脂牛奶封闭 1 h , $1 \times \text{TBST}$ 清洗 3 次,每次 10 min ,加入合适浓度的一抗, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 缓慢摇动过夜,第 2 天取出聚偏二氟乙烯膜, $1 \times \text{TBST}$ 清洗 3 次,每次 10 min ,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h , $1 \times \text{TBST}$ 清洗 3 次,每次 10 min ,加入超敏电化学发光液,发光仪检测抗体结合条带。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件对实验数据进行统计分析,数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间采用完全随机资料的方差分析, 2 组间进行 SNK 法分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

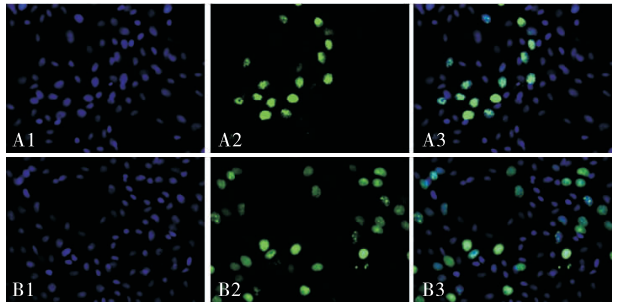
2 结果

2.1 H2 型松弛素促进 VSMC 的增殖 CCK8 试剂盒检测结果显示, 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 $0\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H2 型松弛素作用人 VSMC 24 h 后,吸光度分别为 0.508 ± 0.149 、 0.712 ± 0.169 、 0.947 ± 0.188 、 1.222 ± 0.184 、 1.311 ± 0.456 、 0.325 ± 0.173 , 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 $10^{-5}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H2 型松弛素对人 VSMC 的增殖效应高于 $0\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$),且浓度越高,增殖效应越明显 ($P < 0.05$)。当给予 $10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H2 型松弛素处理 VSMC 0 、 6 、 12 、 24 h ,吸光度分别为 0.329 ± 0.178 、 0.744 ± 0.247 、 0.994 ± 0.294 、 1.225 ± 0.362 , $10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H2 型松弛素处理 VSMC 6 h 就可促进 VSMC 的增殖,且呈一定的剂量和时间依赖性 ($P < 0.05$)。EdU 掺入实验结果表明, $10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H2 型松弛素作用人 VSMC,处于 S 期细胞的百分比 [$(8.377 \pm 3.179)\%$] 显著高于 $0\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H2 型松弛素 [$(25.06 \pm 8.812)\%$] ($P < 0.05$) (图 1); $^3\text{H-TdR}$ 掺入实验结果显示 $10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H2 型松弛素作用人 VSMC,其 DNA 合成速率 (2.804 ± 0.815) 显著高于 $0\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H2 型松弛素 (1.000 ± 0.503) ($P < 0.05$)。免疫印迹检测结果显示 H2 型松弛素对人 VSMC 有一定的促增殖效应 (图 2)。

2.2 H2 型松弛素促进 VSMC 表型转换 结果见图 3。 $10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H2 型松弛素处理 12 h 可降低 VSMC 收缩表型蛋白标志物 $\alpha\text{-SMA}$ 和 $\text{SM22}\alpha$ 的蛋白表达,但可增加 VSMC 合成表型蛋白标志物 OPN 的表达。 $10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H2 型松弛素处理 VSMC 24 h 可进一步促进其表型转变。

2.3 H2 型松弛素调控 VSMC 细胞周期蛋白表达 结果见图 4。 $10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H2 型松弛素处理

12 h 可显著增加细胞周期调节蛋白 cyclin D1 和 cyclin E 的表达,但是却显著降低细胞周期蛋白依赖激酶抑制因子 P27 的表达, $10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H2 型松弛素处理 VSMC 24 h 可进一步增强对细胞周期蛋白的调控作用。



$A_1 \sim A_3$: 对照组; $B_1 \sim B_3$: H2 型松弛素实验组。
图 1 $10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H2 型松弛素促进人 VSMC EdU 掺入
Fig.1 Relaxin-2 ($10^{-6}\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) promotes the EdU incorporation

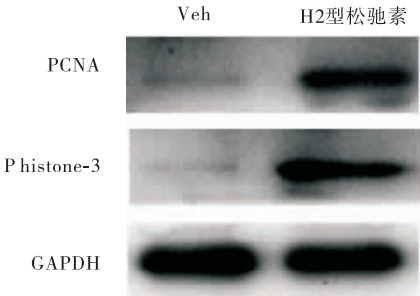


图 2 H2 型松弛素作用 VSMC 增殖标志物的表达
Fig.2 Expression of proliferation marker of VSMC incubated relaxin-2

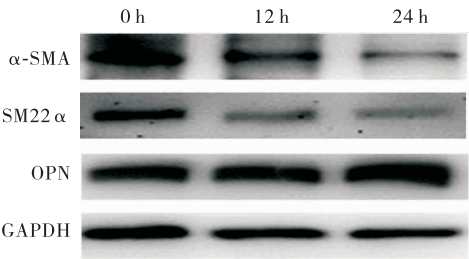


图 3 H2 型松弛素调控 VSMC 的表型的转换
Fig.3 Transformation of VSMC cellular phenotype regulated by relaxin-2

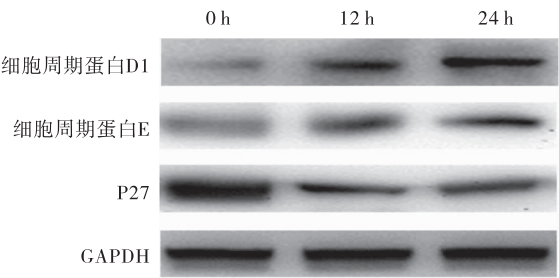


图 4 H2 型松弛素调控 VSMC 细胞周期蛋白的表达
Fig.4 Expression of VSMC cyclin regulated by relaxin-2

2.4 H2 型松弛素激活 p-65, Akt 和 ERK 信号通路 结果见图 5。免疫印迹结果表明 $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H2 型松弛素处理 VSMC 12、24 h 均可显著激活 NF- κ B p65、Akt 及 ERK 等增殖相关信号通路。

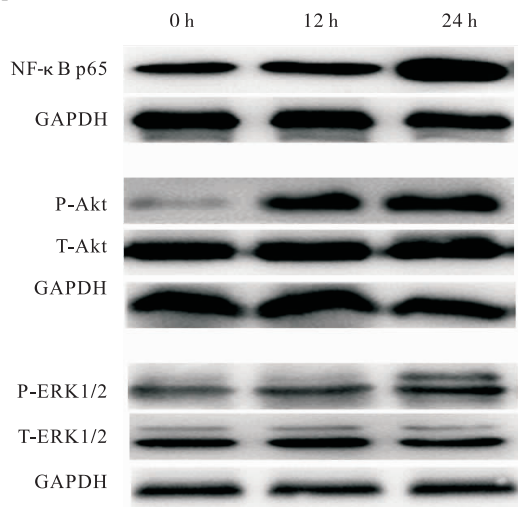


图 5 H2 型松弛素调控 VSMC 增殖相关基因

Fig. 5 Expression of proliferation related gene of VSMC regulated by relaxin-2

3 讨论

研究表明, VSMC 过度增殖并迁移至内膜, 分泌大量的细胞外基质, 在血管成形术后再狭窄和动脉粥样硬化的发生、发展中起重要作用。因此, 寻找参与 VSMC 增殖的关键分子成为临床治疗血管增殖性疾病的重要策略^[10]。松弛素是生殖系统的一种肽类激素, 具有松弛盆腔结缔组织的功效, 结构与胰岛素相似, 有 53 个氨基酸组成, 具有双链结构, 其家族共有 7 个成员, H2 型松弛素是其亚型之一, 主要由黄体分泌, 也是人体循环中最主要的存在形式^[11]。研究发现松弛素具有调控妊娠期子宫及宫颈重塑和生长, 松弛盆腔结缔组织、软化产道, 从而促进分娩的作用^[12]。另外, 松弛素具有降低血压、增加心输出量和心率、减轻心脏缺血再灌损伤、抗纤维化、治疗心力衰竭等心血管保护作用^[13]。

CCK-8 是目前广泛应用于细胞增殖的重要检测手段, CCK-8 结果表明 H2 型松弛素无抑制 VSMC 增殖的作用, 相反却可剂量和时间依赖性促进 VSMC 增殖。EdU 是一种胸腺嘧啶核苷类似物, 在细胞增殖时能够插入正在复制的 DNA 分子中, 可以有效检测处于 S 期的细胞百分数, EdU 染色结果表明, H2 型松弛素可增加 EdU 阳性细胞数, 结合³H-TdR 掺入实验结果, 进一步证实 H2 型松弛素可促进 VSMC DNA 合成速率, 免疫印迹通过检测细胞增殖标志物 P-histone 3 和 PCNA 的表达, 结合这些结

果, 作者推测 H2 型松弛素具有促 VSMC 增殖的作用, 但过去 H2 型松弛素在心血管系统一直被认为是具有保护作用的肽类激素, 为什么对 VSMC 具有促增殖效应呢? 结合松弛素与胰岛素具有相似的结构, 查阅文献发现, 胰岛素也能促进 VSMC 的增殖与迁移^[14], 另外, 阅读文献时发现 apelin 也具有保护心血管系统的多肽^[15], 其心血管保护功能与松弛素相似, 但体外实验却发现 apelin 能够促进 VSMC 的增殖^[16], 敲除 apelin 可以显著减轻血管损伤引起的内膜增生^[17]。此外, 研究发现, 松弛素在很多肿瘤的发生、发展中起到了促进作用, 包括肝癌细胞^[18]和乳腺癌细胞^[5], 结合以上研究和实验结果, 证实 H2 型松弛素具有促进 VSMC 增殖的效应。

VSMC 表型转换是细胞获得增殖迁移能力的始动步骤, 正常的 VSMC 呈非增殖性的收缩表型, 当血管受到介入治疗损伤或者其他刺激时, VSMC 会转化为具有增殖性的合成表型。具有合成表型的 VSMC 可合成和分泌多种生长因子, 引起 VSMC 过度增殖, 引起血管壁增厚、血管腔狭窄、血管顺应性降低和血管重构, 引起血管术后再狭窄和动脉粥样硬化等疾病的发生^[19]。本研究结果也证实, H2 型松弛素可通过降低 VSMC 收缩表型蛋白标志物 α -SMA 和 SM22 α 的蛋白表达, 增加 VSMC 合成表型蛋白标志物 OPN 的表达来促进 VSMC 表型转换, 使 VSMC 获得增殖能力。

细胞周期蛋白 D1 和细胞周期蛋白 E 是调节细胞周期 G₀ 期向 S 期转变的关键因子, 参与细胞周期的调控。P27 作为细胞周期蛋白依赖激酶抑制因子对细胞周期起负性调控作用, 是细胞周期调控的关键因子, 本研究结果发现, H2 型松弛素可显著增加细胞周期调节蛋白 D1 和 E 的表达, 但是却显著降低细胞周期蛋白依赖激酶抑制因子 P27 的表达, 说明 H2 型松弛素可通过调控细胞周期蛋白来促进 VSMC 由 G₀ 期向 S 期转变, 引起 VSMC 增殖。

研究发现, NF- κ B p65、Akt 及 ERK 等增殖相关信号通路参与了肿瘤坏死因子- α 、血管紧张素 II、人血小板源性生长因子等多种因子诱导的 VSMC 的增殖效应^[20-21], 此外, 松弛素可以激活 NF- κ B p65 信号通路使人 THP-1 细胞分泌基质金属蛋白酶-9^[22]。H2 型松弛素可通过激活 Akt/GSK3 β 信号通路促进人类绒毛外滋养细胞的增殖^[23], 还有研究发现, Relaxin 可通过激活 Akt/VEGF 信号通路、基质金属蛋白酶-9 的表达参与了人骨肉瘤骨肉瘤细胞生物学效应^[24]。松弛素可以激活 ERK 和 NF- κ B p65 信号通路减弱内皮素诱导的血管收缩。本研究免疫印迹结果显示, H2 型松弛素处理 VSMC 12、24 h 均可显

著激活 NF- κ B p65、Akt 及 ERK 等增殖相关信号通路。此结果表明 NF- κ B p65、Akt 及 ERK 信号通路参与 H2 型松弛素的促 VSMC 增殖效应。

综上所述,H2 型松弛素对人 VSMC 具有促增殖效应,可能与调控细胞周期蛋白,激活 NF- κ B p65、Akt 及 ERK 等增殖相关信号通路,并引起 VSMC 表型转化有关,H2 型松弛素可能成为治疗血管成型术后狭窄和动脉粥样硬化等心血管疾病的新靶点。另外,值得注意的是,VSMC 增殖和其迁移密切相关,VSMC 发生迁移是细胞骨架发生的重建过程。VSMC 表型转换及 NF- κ B p65、Akt 及 ERK 等相关信号通路在 VSMC 的迁移中也发挥重要作用。关于 H2 型松弛素对 VSMC 迁移的生物学效应,以及其在动脉损伤后新生内膜增生中的作用,将成为下一步研究的重点。

参考文献:

[1] Nair V B, Samuel C S, Separovic F, *et al.* Human relaxin-2: historical perspectives and role in cancer biology[J]. *Amino Acids*, 2012, 43(3):1131-1140.

[2] Dschietzig T B. Recombinant human relaxin-2: (how) can a pregnancy hormone save lives in acute heart failure[J]. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2014, 14(5):343-355.

[3] Ma J, Niu M, Yang W, *et al.* Role of relaxin-2 in human primary osteosarcoma[J]. *Cancer Cell Int*, 2013, 13(1):59.

[4] Feng S, Agoulnik I U, Li Z, *et al.* Relaxin/RXFP1 signaling in prostate cancer progression[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1160:379-380.

[5] Cao W H, Liu H M, Liu X, *et al.* Relaxin enhances *in vitro* invasiveness of breast cancer cell lines by upregulation of S100A4/MMPs signaling[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(5):609-617.

[6] Figueiredo K A, Rossi G, Cox M E. Relaxin promotes clustering, migration, and activation states of mononuclear myelocytic cells[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1160:353-360.

[7] Zheng B, Han M, Wen J K. Role of Kruppel-like factor 4 in phenotypic switching and proliferation of vascular smooth muscle cells[J]. *IUBMB Life*, 2010, 62(2):132-139.

[8] Sun H J, Liu T Y, Zhang F, *et al.* Salusin-beta contributes to vascular remodeling associated with hypertension via promoting vascular smooth muscle cell proliferation and vascular fibrosis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(9):1709-1718.

[9] Elies J, Johnson E, Boyle J P, *et al.* H2S does not regulate proliferation via T-type Ca^{2+} channels[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 461(4):659-664.

[10] Kandadi M R, Stratton M S, Ren J. The role of Src homology 2 containing protein tyrosine phosphatase 2 in vascular smooth muscle cell migration and proliferation[J]. *Acta Pharmacol Sin*,

2010, 31(10):1277-1283.

[11] Callander G E, Bathgate R A. Relaxin family peptide systems and the central nervous system[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(14):2327-2341.

[12] Ivell R, Einspanier A. Relaxin peptides are new global players[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2002, 13(8):343-348.

[13] Bigazzi M, Bani D, Sacchi T B. Relaxin: a possible future preventive therapy for cardiovascular disease in postmenopausal women and men[J]. *Climacteric*, 2001, 4(2):137-143.

[14] Blumensatt M, Wronkowitz N, Wiza C, *et al.* Adipocyte-derived factors impair insulin signaling in differentiated human vascular smooth muscle cells via the upregulation of miR-143[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(2):275-283.

[15] AlSaif S, Mumtaz S, Wray S. A short review of adipokines, smooth muscle and uterine contractility[J]. *Life Sci*, 2015, 125:2-8.

[16] Liu Q F, Yu H W, You L, *et al.* Apelin-13-induced proliferation and migration induced of rat vascular smooth muscle cells is mediated by the upregulation of Egr-1[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 439(2):235-240.

[17] Kojima Y, Kundu R K, Cox C M, *et al.* Upregulation of the apelin-APJ pathway promotes neointima formation in the carotid ligation model in mouse[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 87(1):156-165.

[18] Pan H Z, Dong A B, Wang L, *et al.* Significance of relaxin-2 expression in hepatocellular carcinoma: relation with clinicopathological parameters[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(8):1095-1101.

[19] 毛晓东,程卓安,郑建普. 糖尿病中血管平滑肌细胞表型转化机制及中医药干预[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(24):4723-4727.

[20] Wu M, Huang C, Li X, *et al.* LRRC4 inhibits glioblastoma cell proliferation, migration, and angiogenesis by downregulating pleiotropic cytokine expression and responses[J]. *J Cell Physiol*, 2008, 214(1):65-74.

[21] Yang J S, Wu C C, Lee H Z, *et al.* Suppression of the TNF-alpha level is mediated by Gan-Lu-Yin (traditional Chinese medicine) in human oral cancer cells through the NF-kappa B, AKT, and ERK-dependent pathways[J]. *Environ Toxicol*, 2015, [Epub ahead of print].

[22] Ho T Y, Yan W, Bagnell C A. Relaxin-induced matrix metalloproteinase-9 expression is associated with activation of the NF-kappaB pathway in human THP-1 cells[J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 81(5):1303-1310.

[23] Astuti Y, Nakabayashi K, Deguchi M, *et al.* Human recombinant H2 relaxin Induces AKT and GSK3beta phosphorylation and HTR-8/SVneo cell proliferation[J]. *Kobe J Med Sci*, 2015, 61(1):E1-E8.

[24] Ma J F, Von Kalle M, Plautz Q, *et al.* Relaxin promotes *in vitro* tumour growth, invasion and angiogenesis of human Saos-2 osteosarcoma cells by AKT/VEGF pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(10):1345-1350.

(本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)