论著

文章编号:1000-5404(2009)13-1302-03

复合培养对低氧时肺动脉平滑肌细胞表达细胞因子的调节

张志远[1],钱 频[2],王建春[1],程 序[3],刘 婷[1],钱桂生[1],王关嵩[1] (第三军医大学新桥医院:[1]全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,[2]超声科,重庆 400037;[3]重庆市垫江县中医院,重庆 408343)

摘 要:目的 研究低氧对肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cells,PASMCs)白细胞介素-1β、4、10、13(IL-1β、4、10、13)活性的影响,及复合培养下肺微血管内皮细胞(pulmonary microvascular endothelial cells,PMVECs)对其调控作用。**方法** 大鼠PASMCs单独培养或与PMVECs复合培养,分为正常组、低氧作用2 h(H_2)、6h(H_6)、12 h(H_{12})、24 h(H_{24})组,采用ELISA法测定各组培养细胞上清中IL-1β、IL-4、IL-10、IL-13的活性。**结果** 低氧刺激后PASMCs的IL-1β、IL-4、IL-10、IL-13活性2 h开始升高,6 h达高峰,12 h降低;各时相点复合培养组均低于对应的单独培养组($P<0.01$)。**结论** 低氧可以激活PASMCs的IL-1β、IL-4、IL-10、IL-13活性,在复合培养条件下,PMVECs对此效应具有下调性影响。

关键词: 低氧;复合培养;肺动脉;平滑肌细胞;肺微血管内皮细胞;白细胞介素

中图法分类号: R322.121; R364.4; R563.02 **文献标识码:** A

Effect of cocultured pulmonary microvascular endothelial cells on cytokine expressions in pulmonary arterial smooth muscle cells after hypoxic exposure

ZHANG Zhi-yuan[1], QIAN Pin[2], WANG Jian-chun[1], CHENG Xu[3], LIU Ting[1], QIAN Gui-sheng[1], WANG Guan-song[1] ([1]Institute of Respiratory Diseases, [2]Department of Ultrasound Diagnosis, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [3]Department of Traditional Chinese Medicine Hospital of Dianjiang County, Chongqing 408343, China)

Abstract: Objective To study the effect of hypoxia on the expressions of interleukin-1β, 4, 10, and 13 (IL-1β, IL-4, IL-10 and IL-13) in pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs) and the regulative role of cocultured pulmonary microvascular endothelial cells (PMVECs). **Methods** Rat PASMCs were cocultured with or without rat PMVECs, and randomly divided into 5 groups, normal group (N), 2-hour hypoxia (H2), 6-hour hypoxia (H6), 12-hour hypoxia (H12), and 24-hour hypoxia (H24). The expressions of IL-1β, IL-4, IL-10 and IL-13 in the supernatant were detected with ELISA. **Results** The expression levels of IL-1β, IL-4, IL-10 and IL-13 was increased in H2 group, peaked in H6 group, and then decreased in H12 group. However, the expression levels of above-mentioned cytokines in cocultured groups were significantly lower than those in corresponding hypoxia group. **Conclusion** Hypoxia can enhance activities of IL-1β, IL-4, IL-10, and IL-13 in PASMCs, but this enhancement can be down-regulated by cocultured PMVECs.

Key words: hypoxia; coculture; pulmonary artery; smooth muscle cells; pulmonary microvascular endothelial cells; interleukin

低氧性肺血管重构是原发性肺动脉高压、肺心病等多种呼吸系统疾病的共同的病理基础。在体情况下,是由内皮细胞、平滑肌细胞等多种细胞与细胞外基质共同参与的复杂的病变过程,多种细胞相互调控、相互影响、以一种网络的形式发挥作用。既往的研究多集中于低氧对PASMCs的增殖与迁移的影响,而对细胞因子分泌的影响及两种细胞间的调控关系研究较少。因此本研究利用复合细胞培养模型,探讨低氧对肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cells,PASMCs)细胞因子分泌的影响,及肺微血管内皮

基金项目: 国家自然科学基金(30770928),全军医学科研"十一五"计划科技攻关项目(06G083,08G093)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30770928) and the Tackling Program of the "Eleventh Five-year Plan" of PLA (06G083 and 08G093)

作者简介: 张志远,男,吉林省梨树县人,博士研究生,主治医师,主要从事低氧肺血管重建的发病机制及防治方面的研究。电话:(023)68755320,E-mail:zhangzhiyuan@foxmail.com

通信作者: 钱桂生,E-mail:qiangs@mail.tmmu.com.cn
王关嵩,E-mail:wanggs2003@gmail.com

收稿日期: 2008-12-20;**修回日期:** 2009-03-12

细胞(pulmonary microvascular endothelial cells, PMVECs)对其调控作用。

1　材料与方法

1.1　材料

胶原酶Ⅰ型,弹性蛋白酶 Ⅳ型,牛血清白蛋白(Sigma 公司),DMEM 培养基,胎牛血清,胰蛋白酶,HBSS(Hyclone 公司),抗 IL-1β、IL-4、IL-10、IL-13 的 ELISA 试剂盒(Diaclone, France),酶标仪 Vmax(Molecular Devices, USA)。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　　大鼠 PASMCs 的培养及鉴定见文献[1],大鼠 PMVECs 的培养及鉴定见文献[2]。采用套皿法进行复合培养,即先将 PMVECs 种植于滤膜上,PASMCs 培养在 6 孔板上,然后将二者套接在一起进行复合培养[3]。

1.2.2　低氧处理　　利用自制的缺氧小室,将已配好的低氧气体置换进容器内。并间断抽气后用血气分析仪监测容器内的氧分压,保持在 3% 左右。

1.2.3　实验分组　　当两种细胞传代至 5 ~ 8 代时,用 0.25% 胰蛋白酶(含 0.02 % EDTA)将满瓶的细胞消化传代。分成以下组:常氧组(N)、低氧 2 h 组(H2)、6 h 组(H6)、12 h 组(H12)及 24 h 组(H24)。每组 4 瓶($n=4$),再以上述方法进行复合培养。

1.2.4　IL-1β、IL-4、IL-10、IL-13 活性的检测　　参照试剂盒操作指南进行。最后于酶标仪 450 nm 下读取光吸收值。利用酶标仪的计算及图形拟合功能,制作标准曲线,计算各待测样品的含量。

1.3　统计学分析

所有结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 程序进行 F 检验和 q 检验。

2　结果

2.1　低氧时单独培养与复合培养的 PASMCs IL-1β 活性的变化

低氧激活 IL-1β 的活性。低氧 2 h 活性升高,低氧 6 h 时活性最高,低氧 12 h 活性降低;单独培养组的水平高于复合培养组($P<0.01$),结果见表 1。

表 1　低氧时单独培养与复合培养的 PASMCs IL-1β 活性的变化(pg/ml, $\bar{x} \pm s, n=4$)

培养方式	常氧组	低氧 2 h 组	低氧 6 h 组	低氧 12 h 组	低氧 24 h 组
单独培养	88.65 ± 12.35^{c}	269.35 ± 29.81^{abc}	536.34 ± 52.36^{ac}	478.65 ± 34.25^{abc}	235.85 ± 19.47^{abc}
复合培养	72.34 ± 18.55	206.65 ± 38.69^{ab}	430.88 ± 41.67^{a}	387.66 ± 36.97^{ab}	215.43 ± 23.66^{ab}

a:$P<0.01$,与常氧组比较; b:$P<0.01$,与低氧 6 h 组比较;
c:$P<0.01$,与复合培养比较

2.2　低氧时单独培养与复合培养的 PASMCs IL-4 活性的变化

低氧激活 IL-4 的活性。低氧 2 h 活性升高,低氧 6 h 时活性最高,低氧 12 h 活性降低;单独培养组的水平高于复合培养组($P<0.01$)。各组均低于 6 h 组($P<0.01$)。各单独培养组明显高于对应时相点的复合培养($P<0.01$)。结果见表 2。

表 2　低氧时单独培养与复合培养的 PASMCs IL-4 活性的变化(pg/ml, $\bar{x} \pm s, n=4$)

培养方式	常氧组	低氧 2 h 组	低氧 6 h 组	低氧 12 h 组	低氧 24 h 组
单独培养	68.34 ± 10.52^{c}	184.61 ± 33.51^{abc}	264.71 ± 26.33^{ac}	149.32 ± 22.35^{abc}	103.55 ± 32.75^{abc}
复合培养	59.53 ± 21.35	122.75 ± 20.16^{ab}	216.12 ± 24.72^{a}	134.54 ± 11.78^{ab}	96.88 ± 22.05^{ab}

a:$P<0.01$,与常氧组比较; b:$P<0.01$,与低氧 6 h 组比较;
c:$P<0.01$,与复合培养比较

2.3　低氧时单独培养与复合培养的 PASMCs IL-10 活性的变化

低氧激活 IL-10 的活性。低氧 2 h 活性升高,低氧 6 h 时活性最高,低氧 12 h 活性降低;单独培养组的水平高于复合培养组($P<0.01$)。各组均低于 6 h 组($P<0.01$)。各单独培养组明显高于对应时相点的复合培养($P<0.01$)。结果见表 3。

表 3　低氧时单独培养与复合培养的 PASMCs IL-10 活性的变化(pg/ml, $\bar{x} \pm s, n=4$)

培养方式	常氧组	低氧 2 h 组	低氧 6 h 组	低氧 12 h 组	低氧 24 h 组
单独培养	151.32 ± 13.25^{c}	328.55 ± 29.65^{abc}	549.36 ± 44.67^{ac}	406.33 ± 35.18^{abc}	316.33 ± 35.61^{abc}
复合培养	112.65 ± 12.11	291.56 ± 26.57^{ab}	504.82 ± 40.36^{a}	342.67 ± 28.54^{ab}	256.73 ± 21.73^{ab}

a:$P<0.01$,与常氧组比较; b:$P<0.01$,与低氧 6 h 组比较;
c:$P<0.01$,与复合培养比较

2.4　低氧时单独培养与复合培养的 PASMCs IL-13 活性的变化

低氧激活 IL-13 的活性。低 2 h 活性升高,低氧 6 h 时活性最高,低氧 12 h 活性降低;单独培养组的水平高于复合培养组($P<0.01$)。各组均低于 6 h 组($P<0.01$)。各单独培养组明显高于对应时相点的复合培养($P<0.01$)。结果见表 4。

表 4　低氧时单独培养与复合培养的 PASMCs IL-10 活性的变化(pg/ml, $\bar{x} \pm s, n=4$)

培养方式	常氧组	低氧 2 h 组	低氧 6 h 组	低氧 12 h 组	低氧 24 h 组
单独培养	14.23 ± 3.69^{c}	26.69 ± 5.14^{abc}	48.62 ± 5.78^{ac}	42.28 ± 5.03^{abc}	36.25 ± 4.19^{abc}
复合培养	11.65 ± 3.13	21.65 ± 5.21^{ab}	36.73 ± 5.50^{a}	30.18 ± 5.24^{ab}	28.35 ± 5.07^{ab}

a:$P<0.01$,与常氧组比较; b:$P<0.01$,与低氧 6 h 组比较;
c:$P<0.01$,与复合培养比较

3　讨论

低氧性血管重构是由多种血管细胞相互影响、共同参与的病理过程。低氧不仅可以诱发 PASMCs 的过度增殖与迁移,还可通过分泌多种细胞因子而参与继发性炎症反应[4],而 PMVECs 由于其特殊的分布——分布最广与位于血管的内衬面,使其具有对低氧损害反应最早、最直接的特点,并可通过产生多种血管活性物质来对其他细胞产生调控作用。因此,本研究旨在探讨低氧对 PASMCs 分泌 IL-1β、IL-4、IL-10、IL-13 等细胞因子的影响,及复合培养时 PMVECs 对其调控作用。

我们的实验结果显示,低氧时单独培养的 PASMCs 的 IL-1β、IL-4、IL-10、IL-13 活性均增高,其表

达规律呈时间依赖性,低氧作用 2 h 活性开始升高,6 h 达高峰,12 h 则明显降低。当与 PMVECs 复合培养后,以上细胞因子的活性均低于对应时相点的各单独培养组。以上结果提示低氧时 PASMCs 可能能过分泌 IL-1β、IL-4、IL-10、IL-13 等参与对低氧的应激反应,而这种效应同时又受 PMVECs 的调控,PMVECs 对其活化水平具有下调的影响,可能具有防止细胞因子释放过度放大的作用。

细胞因子与低氧性疾病的关系密切,多种低氧相关性疾病,如 COPD、肺间质纤维化、原发性肺动脉高压等均发现有多种细胞因子参与发病[5],如 IL-1β、IL-6, TNF-α、单核细胞趋化蛋白(monocyte chemoattractant protein,MCP-1)等。这些细胞因子种类繁多,以一种网络的形式发挥作用。本研究中 IL-1β、IL-4 是两种致炎性细胞因子。IL-1 是在局部和全身炎症反应中起核心作用的细胞因子,它能诱导其他炎症细胞因子(如 IL-6)、趋化因子、粘附分子、急性时相蛋白和组织重建酶等的合成。已有研究证实低氧可激活 IL-1 的表达[6]。IL-4 是多效性细胞因子,在调节 T 细胞分化、调控免疫球蛋白亚型的转换过程中发挥重要作用。IL-4 还可促进单核细胞表达 MHC II 类分子、CD13、CD23 等,诱导单核细胞向巨噬细胞分化。低氧对 PASMCs IL-4 的影响尚少见报道。而 IL-10 与 IL-13 是两种具有抑制炎症作用的细胞因子。IL-10 可抑制 LPS 活化人单核细胞产生多种细胞因子,如 IL-1α、IL-6、IL-8、TNF-α 等,还能抑制活化中性粒细胞和嗜酸性粒细胞产生促炎细胞因子和趋化性细胞因子。低氧情况下 IL-10 除了参与炎症反应,还具有促进血管形成的作用[7],提示其在血管自身功能的维护、损伤后修复的过程中发挥作用。IL-13 也可抑制单核细胞 IL-1、IL-6、IL-8、TNF-α 等多种促炎细胞因子的产生,并能抑制 NO 和组织因子的产生。低氧作用后 IL-1β、IL-4 升高提示低氧可能激发 PASMCs 的继发性炎症反应,而同时又伴有炎症抑制因子如 IL-10 与 IL-13 的释放,这反映了低氧应激情况下 PASMCs 的一种自身调控过程。

在体情况下,PASMCs 不是孤立的发挥效应,同时又受着其他多种细胞的影响与调控,最终以一种整体的方式而发挥效应。在此过程中,PASMCs 与血管内皮细胞的相互调节较受重视。已有研究发现,低氧时内皮细胞的存在可以促进 PASMCs 对钙离子的敏感性,从而诱发肺动脉高压的形成[8]。PMVECs 对 PASMCs 的增殖[9]具有促进作用。而 VSMCs 对内毒素与细胞因子导致的 VECs 的损害具有保护作用[10]。但两种细胞间在细胞因子分泌方面的调控尚少见报道。我们的研究显示 PMVECs 对低氧刺激下 PASMCs 分泌细胞因子具有下调的作用。这反映了在体情况下两种细胞间的互相联系,互相调控的复杂的信号交流过程。

在体内 PMVECs 与 PASMCs 在空间上并无直接接触,因此其相互作用可能是通过分泌一些血管活性物质,由血流运达靶细胞而实现的。但具体哪些物质参与了低氧时 PASMCs 对 PMVECs 的调节尚需进一步研究。

总之,细胞因子对 PASMCs 与 PMVECs 细胞行为的影响可能是复杂的,我们使用复合培养方法研究 PMVECs 对 PASMCs 在细胞因子分泌方面的相互调节,更接近两种细胞在生物体发挥作用的实际情况。但这仅是细胞间相互作用的一小方面,在增殖、凋亡、信号转导等效应方面尚需进一步研究。

参考文献:

[1] 王关嵩,钱桂生,杨晓静,等. 2 种酶消化法培养大鼠血管平滑肌细胞生长特性的比较[J]. 第三军医大学学报,1999, 21(10):765 – 767.

[2] 王关嵩,蔡文琴,钱桂生,等. 肺微血管内皮细胞系的建立及脂多糖作用后酪氨酸激酶受体活性的变化[J]. 第三军医大学学报,2003,25(2):94 – 97.

[3] 王关嵩,蔡文琴,钱桂生. 血管平滑肌细胞与微血管内皮细胞复合培养的方法及其对细胞增生的影响[J]. 解剖科学进展, 2001,7(增刊):44.

[4] Tuder R M,Chacon M, Alger L, *et al*. Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis[J]. J Pathol,2001, 195(3):367 – 374.

[5] Dorfmuller P, Perros F, Balabanian K, *et al*. Inflammation in pulmonary arterial hypertension[J]. Eur Respir J,2003, 22(2):358 – 363.

[6] Cooper A L, Beasley D. Hypoxia stimulates proliferation and interleukin-1alpha production in human vascular smooth muscle cells[J]. Am J Physiol, 1999,277 (4 Pt 2):H1326 – H1337.

[7] Dace D S, Khan A A, Kelly J, *et al*. Interleukin-10 promotes pathological angiogenesis by regulating macrophage response to hypoxia during development[J]. PLoS ONE, 2008, 3(10): e3381.

[8] Aaronson P I, Robertson T P, Knock G A, *et al*. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: mechanisms and controversies[J]. J Physiol, 2006, 570(Pt 1):53 – 58.

[9] Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur A M, *et al*. Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia[J]. Circulation, 2006,113(15):1857 – 1864.

[10] Johnson B A, Pitt B R, Davies P. Pulmonary arterial smooth muscle cells modulate cytokine- and LPS-induced cytotoxicity in endothelial cells[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000,278(3):L460 – L468.

(编辑 栾 嘉)