论著

文章编号:1000-5404(2013)12-1262-05

caveolae 对血管平滑肌细胞增殖的影响及可能机制

李正杨,周 政,杨 辉,刘 俊,赖 挺,安家印,雷 雪 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院神经外科,全军癫痫病诊治中心)

[摘要] **目的** 观察 caveolae 对血管平滑肌细胞增殖的影响及可能机制。**方法** 取培养第 3 代 VSMCs 培养皿中培养。干扰组细胞加甲基-β-环糊精(methyl-β-cyclodextrin, MβCD)(5 mmol/L,DMEM 配置)作用 2 h;对照组加入与 MβCD 等量的 DMEM 作用 2 h 后以 DMEM 冲洗 3 次后正常培养 48 h。采集细胞进行 RT-PCR 检测 Caveolin-1、pSmad2 mRNA 表达变化,Western blot 法检测 Caveolin-1、pSmad2 蛋白表达变化,免疫组化检测 Caveolin-1、TGF-β 受体 1(TGF-βR1)在细胞中的表达分布,CCK-8 法检测细胞增殖能力。**结果** Caveolin-1 在 MβCD 干扰后,基因和蛋白表达水平明显下降($P<0.01$),并且以细胞膜和细胞质高表达为主;而 Smad2 在 MβCD 干扰后,基因和蛋白表达水平明显上升,与正常对照组相比,差异有统计学意义($P<0.01$);并且 TβR-1 在 MβCD 干扰后细胞内表达增加。CCK-8 检测结果显示,MβCD 干扰后,VSMCs 增殖被显著抑制($P<0.01$)。**结论** 破坏 caveolae 结构后可以抑制 VSMCs 的增殖,其可能的机制是 caveolae 被破坏后,TGF-β/Smad 信号通路增强,不能抑制 Smad2 磷酸化和下游的信号转导,从而达到抑制 VSMCs 的增殖的作用。

[关键词] 血管平滑肌细胞;小窝;转化生长因子

[中图法分类号] R322.12;R329.24;R329.28 [文献标志码] A

Effect of caveolae on proliferation in vascular smooth muscle cells

Li Zhengyang, Zhou Zheng, Yang Hui, Liu Jun, Lai Ting, An Jiayin, Lei Xue (Department of Neurosurgery, Center of Epilesy Diagnosis and Teatment, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effect of caveolae on the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs). **Methods** The third generation of VSMCs were cultured *in vitro*, and were incubated with methyl-β-cyclodextrin (MβCD) for 2 h. The VSMCs without any treatment were served as blank control. The mRNA and protein expression levels of Caveolin-1 and pSmad2 in VSMCs were detected by RT-PCR and Western blotting, and the distribution of in Caveolin-1 and pSmad2 in VSMCs was detected by immunohistochemistry. The proliferative rate of VSMCs was analyzed with CCK-8 assay. **Results** Caveolin-1 was highly expressed in cell membrane and nucleus. After MβCD treatment, the mRNA and protein expression levels of Caveolin-1 were significantly lower as compared with the control group ($P<0.01$), while the mRNA and protein expression levels of pSmad2 were significantly higher ($P<0.01$). The expression of TGF-βR1 was increased in cell nucleus after MβCD interference. **Conclusion** Destruction of caveolae can suppress the proliferation of VSMC through enhancing TGF-β/Smad signaling pathway.

[**Key words**] vascular smooth muscle cells; caveolae; transforming growth factor

Corresponding author: Zhou Zheng, E-mail: bigbrain@yahoo.com.cn

迟发性脑血管痉挛(delayed cerebral vasospasm, DCVS)是蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后的严重并发症,也是 SAH 后致死和致残的主要原因。其主要表现是受累动脉管腔狭窄、管壁增厚等形态学改变, DCVS 的发病机制尚未完全阐明[1]。新近研究提示,DCVS 的发生可能与转化生长因子 β1(transforming growth factor-beta1, TGF-β1)、血管内皮生长因子等有关。这些细胞因子积极参与了脑血管壁增厚过程[2]。小窝(caveolae)是细胞质膜表面特异性

[通信作者] 周 政,E-mail:bigbrain@yahoo.com.cn

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130410.1542.007.html(2013-04-10)

的内陷微区,该结构聚集了多种受体分子,如转化生长因子受体、表皮生长因子受体、血小板源性生长因子受体、血管紧张素受体等,在信号通路中起重要的枢纽作用[3]。小窝蛋白-1(Caveolin-1)是caveolae的表面标记蛋白,而且使caveolae保持结构和功能完整。有研究显示,Caveolin-1在调节血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)的收缩和增殖反应中起至关重要的作用[4-5]。而TGF-β可以启动胞内Smads信号系统表达的调控[6]。因此,我们设想在破坏caveolae结构的情况下,是否可以增强TGF-β/Smad途径信号通路,从而抑制VSMCs的增殖,以此研究SAH后脑血管壁增厚的可能机制。本实验通过体外培养VSMCs,利用甲基-β-环糊精(methyl-β-cyclodextrin,MβCD)干扰细胞膜caveolae结构,观察caveolae破坏后对VSMCs增殖和TGF-β/Smad信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

3只1~2月龄SD大鼠,雄性,体质量180~200 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。DMEM/F12细胞培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶(美国HyClone公司);兔抗大鼠Caveolin-1、MβCD(Sigma,USA);Ⅳ型胶原酶(美国Gibco公司)。羊抗大鼠TβR-Ⅰ(Abcom,USA)、兔抗大鼠Phospho-Smad2(CST,USA),兔抗大鼠GAPDH(Santa Cruz,USA);小鼠单抗α-actin抗体(碧云天公司);FITC标记小鼠抗兔IgG,以及TRITC标记小鼠抗羊IgG(北京中杉金桥公司),HRP标记羊抗兔IgG,以及HRP标记兔抗羊IgG二抗(武汉博士德公司),Western blot系列试剂盒(武汉博士德公司)。Trizol(天根生化公司),RNA反转录试剂盒(大连宝生生物公司),*Taq* PCR Master Mix试剂盒(北京天根生物化学公司),琼脂糖(北京鼎国公司)。

1.2 血管平滑肌细胞的分离和培养

大鼠按10 mg/kg腹腔内注射3%戊巴比妥钠麻醉。75%乙醇消毒颈、胸部,手术刀切口颈部,分离出颈总动脉,取出一段浸泡于无菌Hank液的培养皿中。轻轻剥离外膜后,将组织剪成0.5~1 mm^3的小块,送入25 mL培养瓶内,小块间间距大约为0.5 cm,然后将培养瓶翻转放入37 ℃培养箱内干固3 h,向瓶内加入含10% FBS的DMEM F12培养基,平放培养2 d后,可见细胞爬出。3~5 d换液1次,待细胞长到70%~80%汇合时用0.25%的胰酶消化离心后传代培养。

1.3 血管平滑肌细胞的鉴定

取正常培养的第3代细胞接种于内置有盖玻片的24孔板中培养48 h后,常规洗涤、固定后,加入小鼠抗大鼠α-actin(浓度1∶200),在4 ℃条件下过夜,然后用PBS洗涤后,加入山羊抗小鼠TRITC标记二抗(浓度1∶500),37 ℃ 1 h,免疫荧光显微镜下观察。

1.4 细胞分组和药物干扰

取培养第3代细胞接种于90 mm培养皿中培养至70%~80%,用10% FBS的DMEM培养基继续培养24 h后,去除培养基,加入无血清DMEM培养6 h。分为2组:实验组,换用MβCD(5 mmol/L,DMEM配置)作用2 h;正常对照组,换用等量的无血清DMEM作用2 h;2组作用后,用DMEM冲洗3次后正常培养48 h。

1.5 RT-PCR检测Caveolin-1、Smad2 mRNA转录水平

Trizol法分别提取细胞总RNA,紫外分光光度法定量后,按照逆转录试剂盒说明,反转录条件:42 ℃ 10 min,30 ℃ 20 min,99 ℃ 5 min,4 ℃ 4 min。以引物设计软件Primer Premier5.0设计Caveolin-1、Smad2、GAPDH引物,并且由上海生工生物公司合成。Caveolin-1上游引物为5′-AACAGGGCAACATCTACAA-3′,Caveolin-1下游引物为5′-TGGAATAGACACGGCTGA-3′,扩增片段长度为390 bp;Smad2上游引物为5′-GAACCCTTACCACTACCAG-3′,Smad2下游引物为5′-ACTATCACTTAGGCACTCG-3′,扩增片段长度为574 bp;GAPDH上游引物为5′-TATCGGACGCCTGGTTAC-3′,GAPDH下游引物为5′-GCAGGGATGATGTTCTGG-3′,扩增片段长度为588 bp。1 μL DNA样本作为PCR扩增模板,阴性对照扩增模板为去离子水;扩增条件为95 ℃预变性2 min;随后95 ℃ 15 s,退火温度15 s,72 ℃延伸40 s,共35个循环;最后72 ℃延伸5 min。使用加权计算结果进行灰度值对比。

1.6 Western blot检测Caveolin-1、pSmad2蛋白表达

从培养箱中取出2组细胞培养皿置于冰上,加入含有蛋白酶抑制剂cocktail(Roche公司)的细胞裂解液400 μL,用枪头吹打,并用细胞刮将细胞刮于培养皿的一侧,冰上置放20 min,收集裂解液及细胞碎片,14 000 r/min离心10 min后,抽取蛋白上清测定蛋白浓度。然后将蛋白样本用4×SDS上样缓冲液混匀后,煮沸6 min,在10%聚丙烯酰胺凝胶上样电泳1~2 h,PVDF膜转膜、5%脱脂奶粉封闭,37 ℃,1 h,分别加入兔抗大鼠Caveolin-1、兔抗大鼠pSmad2、兔抗大鼠GAPDH一抗工作液(浓度1∶1 200)孵育,4 ℃冰箱过夜;使用TBST 3次漂洗后,加入HRP标记羊抗兔二抗工作液(浓度1∶6 000)室温孵育1 h;加入ECL化学显影剂,用凝胶成像系统成像。

1.7 免疫组化检测Caveolin-1、TGF-βR1在细胞中表达水平

细胞分别处理后,用4%多聚甲醛缓冲液固定,PBS冲洗,先加3%过氧化氢10 min,蒸馏水洗,再加入胰酶消化37 ℃,30 min,PBS冲洗,5% BSA室温封闭30 min,甩掉液体不洗,加一抗是兔抗大鼠Caveolin-1、TGF-βR1,4 ℃冰箱过夜。第2天PBS冲洗,使用HRP标记羊抗兔IgG二抗(博奥森公司),室温孵育2 h,DAB显色,室温5 min,苏木精轻微复染,脱水、透明。光学显微镜进行观察染色效果。染色结果判断标准:选择相同区域、相同条件下的部位,使用IMAGE2软件进行光密

度分析。

1.8 CCK-8法检测血管平滑肌细胞增殖

取对数生长期的血管平滑肌细胞接种于96孔细胞培养板中，每孔加入100 μL，每组设置3个复孔。分别用MβCD（5 mmol/L，DMEM配置）干扰0、24、48、72 h后，分别加入CCK-8试剂10 μL，再孵育4 h后，用波长450 nm酶标仪分别检测光密度值。

1.9 统计学方法

采用SPSS 18.0统计软件，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，行单因素方差分析。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞的鉴定

用小鼠抗大鼠α-actin鉴定，激光共聚焦扫描可见：细胞呈长梭形，α-肌动蛋白与细胞纵轴平行排列，呈丝状或网状，证实为VSMCs。见图1。

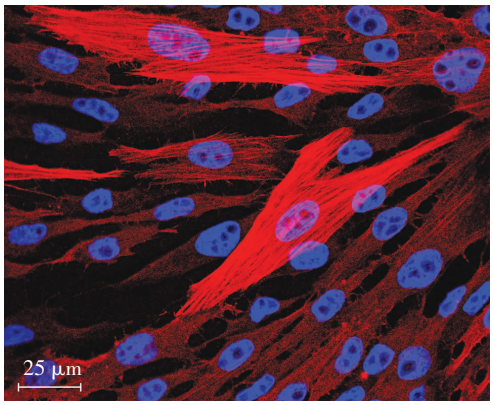


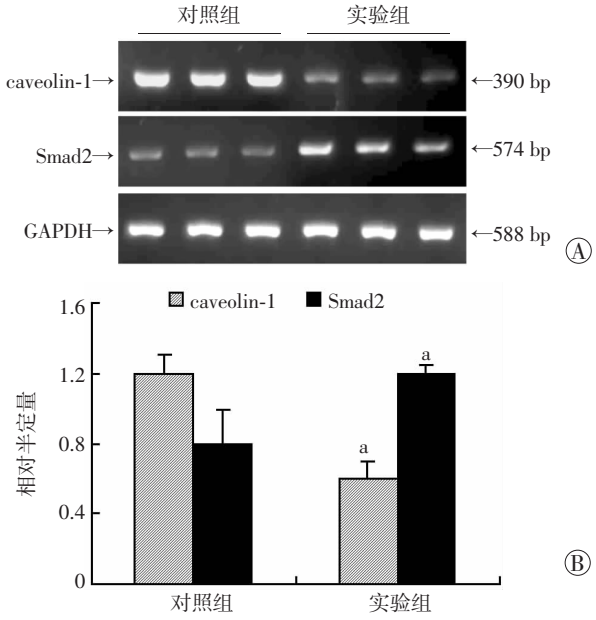
图1 免疫荧光鉴定大鼠血管平滑肌细胞

2.2 MβCD干扰后对平滑肌细胞Caveolin-1、Smad2 mRNA表达水平的影响

RT-PCR检测结果显示，Caveolin-1在MβCD干扰后，mRNA转录水平明显下降。图2显示，Caveolin-1条带大小为390 bp，与预期产物大小保持一致。与正常对照组相比，差异有统计学意义（$P<0.01$）。而Smad2在MβCD干扰后，mRNA转录水平明显上升。图2显示，Smad2条带大小为574 bp，与预期产物大小一致。与正常对照组相比，差异有统计学意义（$P<0.01$）。

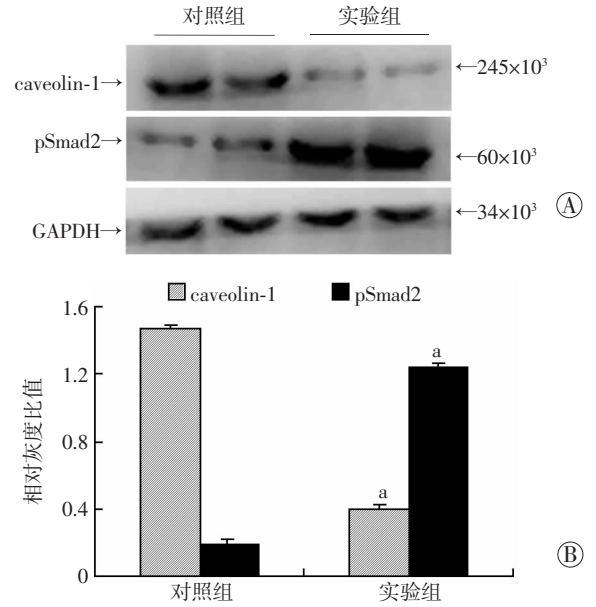
2.3 MβCD干扰后对平滑肌细胞Caveolin-1、pSmad2蛋白转录表达水平的影响

通过应用Western blot进一步证实Caveolin-1在MβC D干扰后，蛋白表达水平明显下降。图3显示，Caveolin-1条带位于 245×10^3 位置左右，与预期产物大小保持一致。与正常对照组相比，差异有统计学意义（$P<0.01$）。而pSmad2在MβC D干扰后，蛋白表达水平明显上升。图3显示，pSmad2条带位于 60×10^3 位置左右，与预期产物大小保持一致。与正常对照组相比，差异有统计学意义（$P<0.01$）



A：RT-PCR结果；B：半定量分析结果 a：$P<0.01$，与对照组比较

图2 RT-PCR检测各组Caveolin-1、Smad2基因的表达



A：Western blot结果；B：半定量分析结果 a：$P<0.01$，与正常对照组比较

图3 Western blot检测各组Caveolin-1、pSmad2蛋白中的表达

2.4 MβCD干扰后对平滑肌细胞Caveolin-1、TβR-1蛋白表达与分布的影响

免疫组织染色化学结果显示，正常对照组细胞质、胞膜中见较多的大量棕黄色颗粒沉积，说明Caveolin-1在正常细胞内较多表达，与此相反，在实验组细胞质、细胞膜中可见较少有棕黄色颗粒沉积，提示Caveolin-1在干扰后细胞内表达减少。而TGF-βR1在正常对照组细胞质、细胞膜中较少有棕黄色颗粒沉积，说明TβR-1在正常细胞内较少表达，与此相反，在实验组细胞质、细胞膜中可见有大量棕黄色颗粒沉积，提示TβR-1在

MβCD 干扰后细胞内表达增加。见图 4。

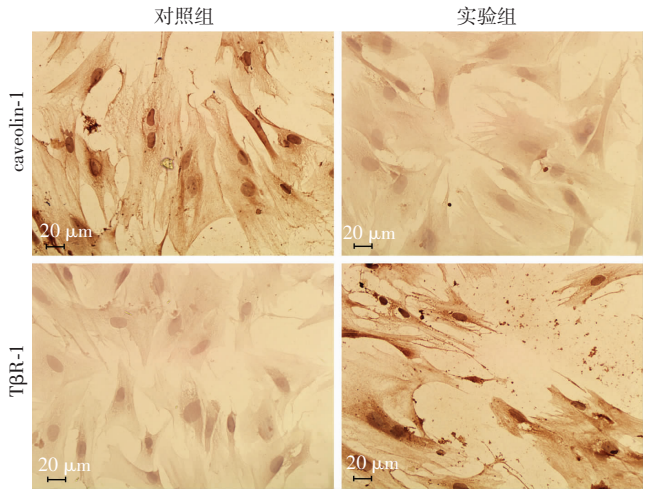
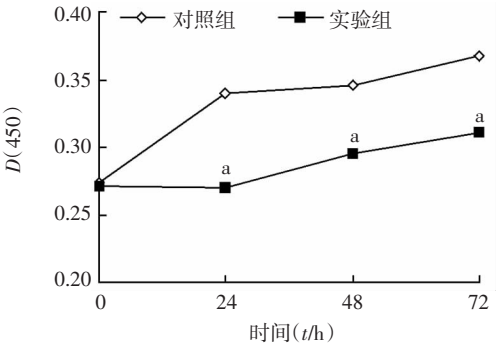


图 4　免疫组化检测 Caveolin-1、TβR-1 蛋白在各组细胞中的表达分布　(IHC)

2.5　MβCD 干扰后对平滑肌细胞增殖的影响

采用 CCK-8 法分析 MβCD 破坏 caveolae 后对血管平滑肌细胞的影响(图 5),实验结果显示与对照组比较,实验组细胞增殖受到抑制($P<0.01$)。



a:$P<0.01$,与正常对照组比较

图 5　CCK-8 检测 MβCD 干扰不同时间后对细胞增殖的影响　($n=3$)

3　讨论

脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)是 SAH 后的常见并发症,发作后可引起脑血管持续性收缩、脑组织弥漫性水肿,以及缺血性神经功能损害等不良结果,对病人生存、预后产生严重影响[1]。目前,关于 DCVS 的发生机制仍然并不完全清楚,但是发现与血管壁增殖有重要的作用[7]。

caveolae 过去研究发现认为细胞膜上特定的微区域,具有典型的脂质双层结构,主要由 caveolin 蛋白、胆固醇、鞘磷脂及糖基鞘磷脂构成,在介导细胞信号转导、胞吞胞饮、膜磷脂代谢等生理过程中发挥重要作用[8]。Caveolin-1 作为 caveolae(小窝)的标记蛋白和重要结构蛋白,参与了 caveolae 的形成以及相关细胞增殖、分化、凋亡和血管生成的信号通路的调控,在神经与其他肿瘤的发生、发展和转移过程有密切关系[9]。Caveolin-1 在平滑肌细胞、脂肪细胞、内皮细胞等终末分化细胞上有着丰富的表达[4]。随着对 Caveolin-1 蛋白研究的深入,人们对其认识加深,发现 Caveolin-1 在 VSMCs 由收缩型向增殖型表型转化信号转导通路中扮演着重要角色[7,10-11]。有研究证实 Caveolin-1 的 82~101 氨基酸残基与 Src 家族酪氨酸激酶(Src family tyrosine kinases)、内皮源性一氧化氮合酶、生长因子受体、G 蛋白及 G 蛋白偶联受体等众多分子结合[12-13]。可见,Caveolin-1 可以认为在细胞信号转导过程中起着调控"阀门"作用。caveolae 结构的稳定为 Caveolin-1 发挥生物学功能提供了保证。

我们已经知道 Smad 信号是 TGβ 的主要下游信号通路之一,在调节 TGFβ 介导的各种生理和病理过程中起到十分重要的作用。胞质蛋白 Smads 是 TGFβ/Smad 信号通路的关键传导分子,包括 Smad2 和 Smad3 蛋白。TGF-β1 是一种广泛表达的细胞因子,属于一个大的超家族,是具有多种功能的细胞因子,其通过细胞表面的受体信号传导途径来达到调控细胞的增殖、分化、凋亡和免疫功能的目的[14]。近年研究发现,TGF-β1 是最常见上调细胞外基质重塑的细胞因子[15]。TGF-β 在细胞外基质积聚和血管重塑中起着至关重要的作用。它主要通过上调几个重要的细胞因子的产生,如结缔组织生长因子(CTGF)和碱性成纤维细胞生长因子[16]。文献研究揭示 DCVS 的发生与 TGF-β1、血管内皮生长因子等有关,该细胞因子积极参与了脑血管壁增殖过程[17]。Seay 等[18]也研究发现 TGF-β1 抑制在体外培养大鼠 VSMC,并且和 TGF-β1 的浓度有关。TGF-β 家族成员可以通过与两种类型的跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶受体异源复合物结合,从而启动细胞的反应。并且,细胞内信号蛋白 Smads 被受体激酶活化后,可以形成异源蛋白复合物,并且转移到核内,与特定的 DNA 序列结合,指导转录,从而实现 TGF-β 对基因表达的调控[6]。

在我们先前的研究中发现,Caveolin-1 蛋白随着痉挛程度的加重表达逐渐减低,与血管痉挛程度呈显著负相关,提示 Caveolin-1 蛋白在 SAH 后脑血管平滑肌

细胞增殖过程中持续下调,可能是抑制血管痉挛平滑肌增殖反应的潜在靶点[7]。在我们的研究中发现,在体外培养的血管平滑肌细胞中,Caveolin-1 蛋白在细胞膜和细胞质中均有表达。MβCD 是作为经典的胆固醇络合剂,可以快速、有效并且选择性去除细胞膜上的胆固醇。尤其是在使用 MβCD 干扰细胞膜 caveolae 结构后,Caveolin-1 核酸转录水平和蛋白表达量明显下降($P<0.01$)。同样,我们的研究也发现,在有效干扰 caveolae 后,Smad 信号因子核酸转录水平和蛋白表达量明显上升($P<0.01$),并且细胞膜和细胞质中均出现强烈高表达。而且,随着 caveolae 的破坏,Caveolin-1 表达下降后,体外培养 VSMCs 增殖受到抑制,与之前的动物实验[7]研究结果相同。我们推测 caveolae 破坏后,TGF-β/Smad 信号通路增强,从而抑制了 VSMCs 的增殖。

综上所述,caveolae 在 SAH 后血管平滑肌细胞增殖的调控过程中起到重要作用。其可能机制是 caveolae 在 TGF-β/Smad 信号通路中起到负调节作用,通过对 TGF-β 的抑制,使 VSMCs 增殖不受影响。可见 caveolae 能作为今后临床预防和治疗 SAH 后的 DCVS 新靶点。

参考文献:

[1] Jeon H, Ai J, Sabri M, *et al*. Neurological and neurobehavioral assessment of experimental subarachnoid hemorrhage[J]. BMC Neurosci, 2009, 10: 103.

[2] Borel C O, McKee A, Parra A, *et al*. Possible role for vascular cell proliferation in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage[J]. Stroke, 2003, 34(2): 427-433.

[3] Ishikawa Y, Otsu K, Oshikawa J. Caveolin; different roles for insulin signal? [J]. Cell Signal, 2005, 17(10): 1175-1182.

[4] Sathish V, Abcejo A J, VanOosten S K, *et al*. Caveolin-1 in cytokine-induced enhancement of intracellular Ca^{2+} in human airway smooth muscle[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011, 301(4): L607-L614.

[5] Halayko A J, Tran T, Gosens R. Phenotype and functional plasticity of airway smooth muscle: role of caveolae and caveolins[J]. Proc Am Thorac Soc, 2008, 5(1): 80-88.

[6] 汪娟, 柳惠图. TGF-β 信号通路中 Smad 蛋白与基因转录调节研究进展[J]. 解剖学报, 2000, 31(增刊): 13-17.

[7] 张旋, 周政, 刘俊, 等. Caveolin-1 与兔蛛网膜下腔出血模型基底动脉平滑肌增殖的关系[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(8): 830-834.

[8] Frank P G, Lisanti M P. Caveolin-1 and caveolae in atherosclerosis: differential roles in fatty streak formation and neointimal hyperplasia [J]. Curr Opin Lipidol, 2004, 15(5): 523-529.

[9] Parat M O, Riggins G J. Caveolin-1, caveolae, and glioblastoma[J]. Neuro Oncol, 2012, 14(6): 679-688.

[10] Sathish V, Abcejo A J, VanOosten S K, *et al*. Caveolin-1 in cytokine-induced enhancement of intracellular Ca^{2+} in human airway smooth muscle[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011, 301(4): L607-L614.

[10] Luo D X, Cheng J, Xiong Y, *et al*. Static pressure drives proliferation of vascular smooth muscle cells *via* Caveolin-1/ERK1/2 pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 391(4): 1693-1697.

[11] Kiyan J, Smith G, Haller H, *et al*. Urokinase-receptor-mediated phenotypic changes in vascular smooth muscle cells require the involvement of membrane rafts[J]. Biochem J, 2009, 423(3): 343-351.

[12] Wood W G, Igbavboa U, Muller W E, *et al*. Cholesterol asymmetry in synaptic plasma membranes[J]. J Neurochem, 2011, 116(5): 684-689.

[13] Thomas S, Overdevest J B, Nitz M D, *et al*. Src and Caveolin-1 reciprocally regulate metastasis *via* a common downstream signaling pathway in bladder cancer [J]. Cancer Res, 2011, 71(3): 832-841.

[14] Kono K, Maeda H, Fujii S, *et al*. Exposure to transforming growth factor-β1 after basic fibroblast growth factor promotes the fibroblastic differentiation of human periodontal ligament stem/progenitor cell lines [J]. Cell Tissue Res, 2013, [Epub ahead of print].

[15] J. Massague J, Blain S W, Lo R S. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders[J]. Cell, 2000, 103(2): 295-309.

[16] Lan T H, Huang X Q, Tan H M. Vascular fibrosis in atherosclerosis [J]. Cardiovasc Pathol, 2013, [Epub ahead of print].

[17] Zhang H, Wang Z W, Wu H B, *et al*. Transforming growth factor-β1 induces matrix metalloproteinase-9 expression in rat vascular smooth muscle cells *via* ROS-dependent ERK-NF-κB pathways[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 375(1/2): 11-21.

[18] Seay U, Sedding D, Krick S, *et al*. Transforming growth factor-beta-dependent growth inhibition in primary vascular smooth muscle cells is p38-dependent[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 315(3): 1005-1012.

(**收稿**:2013-02-17;**修回**:2013-03-27)

(编辑 王小宴)