低氧诱导肺动脉内皮细胞转分化的初步机制研究

胡义杰,李志平,陈建明,沈 诚,宋 毅,钟前进 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所心血管外科,重庆 400042)

[摘 要] **目的** 观察低氧培养下肺动脉内皮细胞转分化现象及转化生长因子 β1(TGF-β1)对内皮细胞转分化的作用机制。**方法** 通过组织贴壁法分离培养的肺动脉内皮细胞,分别在常氧(含 21% O_2、5% CO_2、74% N_2 混合气体)和低氧(含 1% O_2、5% CO_2、94% N_2 混合气体)条件下培养 1、4、7 d,检测细胞形态表型变化和 TGF-β1 表达水平。不同 TGF-β1 或其抑制剂 SD-208 刺激肺动脉内皮细胞,检测平滑肌细胞标准蛋白 α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)的表达,来判断肺动脉内皮细胞转分化情况。**结果** 低氧培养铺路石样肺动脉内皮细胞逐步向 α-SMA 高表达的多角形细胞改变,且 TGF-β1 表达水平明显增高。TGF-β1 能刺激肺动脉内皮细胞可出现 α-SMA 表达的增加,SD-208 可抑制上述改变。**结论** 低氧可促进肺动脉内皮细胞向平滑肌样细胞转分化;TGF-β1 在此过程中发挥重要作用。

[关键词] 肺动脉高压;内皮细胞转分化;转化生长因子 β1

[中图分类号] R543.2 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2013)06-0594-03

Pulmonary arterial endothelial-to-mesenchymal transition induced by hypoxia

HU Yi-jie, LI Zhi-ping, CHEN Jian-ming, SHEN Cheng, SONG Yi, ZHONG Qian-jin (Department of Cardiovascular Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To observe hypoxia-induced pulmonary arterial endothelial-to-mesenchymal transition and investigate the role of transforming growth factor β1 (TGF-β1) in the process. **Methods** Pulmonary arterial cells improved by adherence method were cultured in normoxia (containing 21% O_2, 5% CO_2 and 74% N_2) or hypoxia (containing 1% O_2, 5% CO_2 and 94% N_2) for 1, 4, or 7 days, respectively. Endothelial-to-mesenchymal transition was confirmed with morphological observation and expression of α-smooth muscle actin (α-SMA) by immunocytochemistry. Expression of TGF-β1 was evaluated by RT-PCR and Western blot, and α-SMA by Western blot. **Results** Hypoxia-induced paving-stone-like pulmonary arterial endothelial cells transdifferentiating to polygonal cells with high-expression of α-SMA. TGF-β1 expression was increased significantly after 7 days of hypoxia. TGF-β1 stimulating alone increased α-SMA expression of pulmonary arterial endothelial cells; while, SD-208, inhibitor of TGF-β1, abolished the above effect. **Conclusion** Hypoxia can induce endothelial-to-mesenchymal transition. And TGF-β1 plays an important role in the process.

Keywords: pulmonary arterial hypertension; endothelial-to-mesenchymal transition; transforming growth factor β1

继发性肺动脉高压的主要病理学变化表现为表达 α 平滑肌肌动蛋白(α-Smooth muscle actin, α-SMA)细胞在增厚的血管壁中大量堆积。但关于这些细胞的来源以及大量堆积的机制尚未完全明确[1]。有研究报道肺动脉血管壁中膜常驻平滑肌细胞去分化[2];肺血管外膜的成纤维细胞的分化[3-4];归巢于血管损伤部位的循环祖细胞分化。因此这些表达 α-SMA 表型的成肌纤维细胞具有高度的异质性,其来源可能复杂多样[5];这也可能是目前临床药物治疗效果欠佳的重要原因。近年来有报道认为在肾脏纤维化和心肌纤维化过程中存在内皮细胞向平滑肌样细胞或成肌纤维细胞的转分化[6-7]。那内皮细胞的转分化是否也是肺动脉高压形成中肺动脉壁重塑的机制之一呢? 因此本研究以低氧性肺动脉高压为基本模型,细胞水平对低氧培养肺动脉内皮细胞表型变化及 TGF-β1 在此过程中的作用进行了探索。

1 材料与方法

1.1 肺动脉内皮细胞的原代培养

健康 6 周左右 SPF 级 SD 大鼠(第三军医大学大坪医院野战外科研究所动物房),皮下注射戊巴比妥钠 70 mg/kg 麻醉。碘伏消毒固定大鼠的胸腹部。剪开下腹部腹腔,并沿正中线上延手术切口至颈部,同时打开腹腔和胸腔,暴露出心肺组织。前下提起心肺,剪断主动脉;切除心脏,显露主肺动脉和左右肺动脉干。顺肺动脉干方向,切除肺组织和血管外膜,尽可能多的保留肺动脉并注意避免损伤肺动脉内膜。将 PBS 清洗的节段肺动脉血管,锐性切成小肺血管片。肺动脉内膜面贴壁培养于含 10% 胎牛血清(Hyclone 公司,美国)和支原体去除剂 MRA 50 μl(Mpbio 公司,美国)的 DMEM/F12 培养基中,于 5% CO_2、37 ℃培养箱中孵育。48 ~ 72 h 后,去除血管片并继续培养、传

doi:10.11659/jjssx.1672-5042.201306005

[基金项目] 第三军医大学青年基金资助项目(2010XQN35)

[通讯作者] 钟前进,电话:(023)68757821,E-mail:zhongqianjin@qq.com

[收稿日期] 2013-07-26 [修回日期] 2013-08-07

代。选择第 3 ~ 4 代状态好的肺动脉内皮细胞继续后续试验。

1.2 肺动脉内皮细胞的低氧培养诱导转分化

取对数生长期的肺动脉内皮细胞,做细胞爬片。将细胞爬片和处于对数生长期的细胞放入低氧培养箱(含 1% O_2、5% CO_2、94% N_2 混合气体)、37 ℃恒温孵育。每两天给细胞换液,并在低氧培养 1 d、4 d、7 d 时观察细胞形态,与常氧培养的细胞比较。低氧培养 7 d 结束后,细胞爬片用 4% 中性甲醛固定后 4 ℃保存备用。收取常氧培养和低氧培养的肺动脉内皮细胞,抽提总 mRNA 和总蛋白样本并放 - 80 ℃保存备用。取出固定的细胞爬片,PBS 洗 3 次,用 0.1% Triton 通透 15 min,再用 PBS 洗 3 次,anti-α-SMA 孵育过夜,PBS 洗 3 次后再孵育对应二抗 1 h,PBS 洗 3 次后 DAB 显色 3 min,用 PBS 洗去 DAB 后用中性树脂封片。晾干后去照相。

1.3 TGF-β1 及其抑制剂调节转分化实验分组

大鼠肺动脉内皮细胞在常氧培养下不同浓度 TGF-β1 及其抑制剂刺激后比较各组 α-SMA 蛋白表达差异。取对数生长期的细胞和细胞爬片,按下列条件分别给予刺激。刺激 72 h 后,抽提总蛋白样本并放 - 80 ℃保存备用。TGF-β1 刺激组:①正常对照;②1 ng/mL TGF-β1;③5 ng/mL TGF-β1;④10 ng/mL TGF-β1;⑤50 ng/mL TGF-β1。在最佳 TGF-β1 刺激浓度基础上,设定 TGF-β1/SD-208 刺激分组:①低氧实验组;②常氧组;③SD-208 0.5 μM 刺激组;④SD-208 0.5 μM + 最佳浓度 TGF-β1 刺激组;⑤最佳浓度 TGF-β1 刺激组。

1.4 TGF-β1 mRNA、蛋白表达和 α-SMA 蛋白水平

用 Trizol 一步法提取总 RNA。反转录采用 2 ug 总 RNA。常规 RT-PCR 分析 TGF-β1 mRNA 的水平。TGF-β1 cDNA 的引物:上游引物 5'-GCCCCTACATTTGGAGCCTG-3',下游引物 5'-CAGGAGCGCACGATCATGT-3'。内参 β-actin 引物为:上游引物 5'-ACCCCGTGCTGCTGACCGAG-3',下游引物 5'-TCCCG-GCCAGCCAGGTCCA-3'。BCA 法检测总蛋白浓度。10% SDS-PAGE 胶电泳,电转 NC 膜,封闭后加 anti-TGF-β1 抗体或 anti-α-SMA 及对应的二抗免疫印迹检测 TGF-β1 或 α-SMA 蛋白的表达。

2 结果

2.1 低氧原代培养肺动脉内皮细胞转分化为平滑肌样细胞

肺动脉内皮细胞经贴壁纯化和传代培养后,呈现内皮细胞典型的铺路石样生长(图 1)。随着低氧培养时间的延长,铺路石样内皮细胞逐步向多角形细胞改变。免疫细胞化学染色可见 α-SMA 高表达的平滑肌样细胞改变(图 2)。

2.2 TGF-β 对肺动脉内皮细胞转分化的影响

低氧培养 7 d 细胞 TGF-β1 mRNA 表达水平和蛋白表达水平都高于正常氧浓度培养组(图 3)。随着 TGF-β1 刺激浓度的增加,细胞表达 α-SMA 的水平逐步增加(图 4A)。10 ng/mL TGF-β1 刺激可见 α-SMA 较前增加明显,因此将其设为后续实验的最佳刺激浓度。单纯 10 ng/mL TGF-β1 刺激与低氧所致的 α-SMA 水平增加相似;在予以 TGF-β1 抑制剂 SD-208 后,可见 α-SMA 表达水平几乎恢复正常;单独的 SD-208 对 α-SMA 表达并无显著影响。

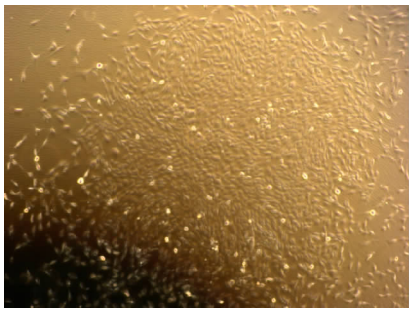


图 1 贴壁培养的肺动脉内皮细胞(×10 倍)

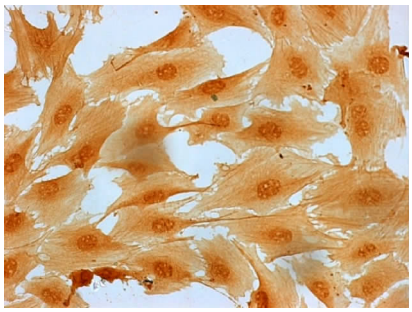
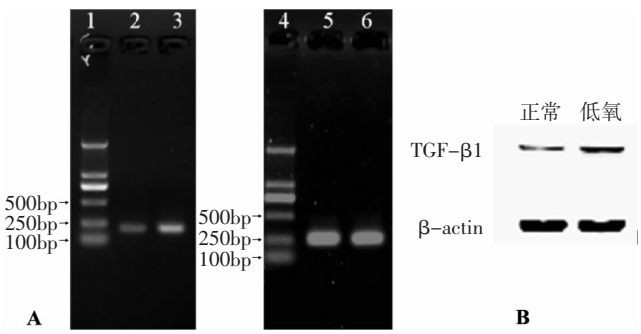
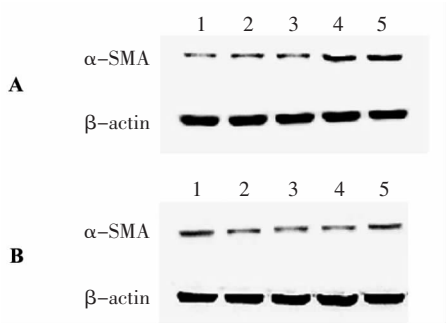


图 2 低氧培养 7 d 后肺动脉内皮细胞转分化为 α-SMA 高表达的平滑肌样细胞(×40 倍)



A:左为 TGF-β1 PCR 电泳;右为内参 β-actin(1、4:标准 Marker DL 2000;2、5:低氧培养组;3、6:正常培养组);B:Western blot 检测 TGF-β1 蛋白表达水平

图 3 低氧培养 7 d 后细胞 TGF-β1 表达水平高于正常组



A:不同浓度 TGF-β1 刺激(1:常氧;2:1 ng/mL TGF-β1;3:5 ng/mL TGF-β1;4:10 ng/mL TGF-β1;5:50 ng/mL TGF-β1);B:单纯 10 ng/mL TGF-β1 刺激和加 SD-208 后(1:低氧;2:常氧;3:SD-208;4:SD - 208 + 10 10 ng/mL TGF-β1;5:10 ng/mL TGF-β1)

图 4 不同刺激条件对肺动脉内皮细胞 α-SMA 表达的影响

3 讨论

肺动脉高压中重塑血管壁组织细胞来源和机制至今尚未完全明确。结合已有研究对心脏、肾脏血管内皮细胞转分化现象的认识,本研究证实贴壁培养的肺动脉内皮细胞在低氧培养条件下,能向平滑肌样细胞转分化;且 TGF-β1 在低氧诱导的肺动脉内皮细胞转分化过程中具有重要意义。

稳定培养肺动脉内皮细胞是研究其转分化现象的基础。目前肺动脉内皮细胞分离培养,主要有酶消化法、切碎并酶消化法、磁珠分离法、组织贴壁培养法。本实验采用了组织贴壁法。通过多次差速贴壁,呈铺路石样生长的内皮细胞相对纯化,在第 3 ~4 代培养后纯度约 98%,为实验的稳定开展提供了基础。

近年来越来越多的证据提示成熟的血管内皮细胞存在转分化现象。在心血管发育过程中,房室管区域内皮细胞表型(CD31)的心内膜细胞逐步分化为间质细胞的心内膜垫内皮细胞[8]。内皮细胞转分化现象也是心肌纤维化、肾脏纤维化过程甚至肿瘤进展的重要机制之一。在 Cre-lox 基因标记的小鼠心肌纤维化模型中发现 27% ~33% 的成纤维细胞起源于内皮细胞[7]。在多个肾脏纤维化模型中,近 30% ~50% 的成纤维细胞同时表达内皮细胞表型 CD31 和成纤维特异蛋白或 α-SMA;而采用内皮细胞系示踪系统证实内皮细胞转分化[9]。在肿瘤进展中发挥重要作用的成纤维细胞,其来源也可能与内皮细胞的转分化相关[10]。本实验证实肺动脉内皮细胞在低氧培养 7 d 后,铺路石样生长肺动脉内皮细胞向多角形的 α-SMA 高表达的平滑肌样细胞转分化。这种内皮细胞转分化来源的细胞可能是血管壁重塑的重要机制之一。

TGF-β1 在机体的损伤修复、炎症反应、组织纤维化和肿瘤血管形成等过程发挥重要作用。近来研究证实 TGF-β1 在心脏、肾脏等多种组织的内皮细胞转分化过程中具有重要作用[9-11]。本研究证实低氧能上调 TGF-β1 的表达水平;而 TGF-β1 能刺激肺动脉内皮细胞向平滑肌样细胞的转分化,抑制 TGF-β1 能减少肺动脉内皮细胞的转分化。故推测低氧性肺动脉高压形成的机制是通过 TGF-β1 信号通路实现的。在其他内皮细胞转分化模型中发现 TGF-β1 可能通过多种机制实现转分化。心肌纤维化模型中,miR-125b 能降低 p53 表达水平,抑制 TGF-β1 介导的内皮细胞转分化[12];单独 miR-21 的过表达可以刺激内皮细胞的转分化,而沉默 miR21 可以降低心肌纤维化[13]。rhBMP 可以拮抗 TGF-β1,减轻心肌纤维化[7]。在低氧性肺动脉高压中 TGF-β1 调节肺动脉内皮细胞转分化的机制尚需更深入的实验予以阐明。

我们的研究为肺动脉高压异构肺血管壁来源和机制提供了实验依据,对临床防治肺动脉高压提供了新思路。但 TGF-β1 在肺动脉内皮细胞转分化过程的作用机制十分复杂,还有待进一步的研究才能全面阐明。

[参考文献]

[1] Humbert M, Morrell NW, Archer SL, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension[J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 43(12 Suppl S): 13S - 24S.

[2] Jalali S, Ramanathan GK, Parthasarathy PT, et al. Mir-206 regulates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and differentiation[J]. PloS one, 2012, 7(10): e46808.

[3] Stenmark KR, Davie N, Frid M, et al. Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling[J]. Physiology (Bethesda), 2006, 21: 134 - 145.

[4] Stenmark KR, Frid MG, Yeager M, et al. Targeting the adventitial microenvironment in pulmonary hypertension: A potential approach to therapy that considers epigenetic change[J]. Pulm Circ, 2012, 2(1): 3 - 14.

[5] Frid MG, Dempsey EC, Durmowicz AG, et al. Smooth muscle cell heterogeneity in pulmonary and systemic vessels. Importance in vascular disease[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17(7): 1203 - 1209.

[6] Li J, Qu X, Bertram JF. Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. Am J Pathol, 2009, 175(4): 1380 - 1388.

[7] Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis[J]. Nat Med, 2007, 13(8): 952 - 961.

[8] Liebner S, Cattelino A, Gallini R, et al. Beta-catenin is required for endothelial-mesenchymal transformation during heart cushion development in the mouse[J]. J Cell Biol, 2004, 166(3): 359 - 367.

[9] Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, et al. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition[J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(12): 2282 - 2287.

[10] Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, et al. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts[J]. Cancer Res, 2007, 67(21): 10123 - 10128.

[11] Piera-Velazquez S, Li Z, Jimenez SA. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders[J]. Am J Pathol, 2011, 179(3): 1074 - 1080.

[12] Ghosh AK, Nagpal V, Covington JW, et al. Molecular basis of cardiac endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT): differential expression of microRNAs during EndMT[J]. Cell Signal, 2012, 24(5): 1031 - 1036.

[13] Kumarswamy R, Volkmann I, Jazbutyte V, et al. Transforming growth factor-β-induced endothelial-to-mesenchymal transition is partly mediated by microRNA-21[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(2): 361 - 369.

(编辑:魏 源)