DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.02.004
第25卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 2
98 2003年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)02-0098-03

低氧对复合培养的平滑肌细胞中白细胞介素-6表达的影响

黄春基[1],周德山[2],张 玉[3],钱桂生[1] (第三军医大学:[1]附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037;[2]基础医学部组织学与胚胎学教研室,重庆 400038;[3]重庆市合川市人民医院内一科,合川 401520)

提 要:目的 研究低氧对复合培养的平滑肌细胞中白细胞介素6(IL-6)表达的影响。方法 低氧处理与肺微血管内皮细胞复合培养的鼠肺动脉平滑肌细胞,采用RT-PCR方法检测常氧组、低氧2、6、12 h组IL-6基因的表达水平,并测定细胞培养上清中IL-6的活性。结果 低氧复合培养2 h组肺动脉平滑肌细胞中IL-6 mRNA表达水平升高,在低氧6h组达最高,低氧12 h组有所降低,但与常氧组比较有明显差别。低氧复合培养2 h组肺动脉平滑肌细胞上清中IL-6的活性明显升高,6 h组细胞上清中IL-6的活性水平最高,12 h组的活性降低,24 h组的水平低于2 h组。IL-6活性水平与其基因表达的水平一致。结论 低氧可以增强复合培养的肺动脉平滑肌细胞中IL-6基因的表达,使细胞培养上清中IL-6活性升高,进而有可能激活其它一些信号转导相关基因调节细胞的低氧反应。

关键词:低氧;复合培养;肺动脉;平滑肌细胞;白细胞介素-6
中图法分类号:R322.74;R392.11;R845.22 文献标识码:A

Enhancement of interleukin-6 expression in cocultured pulmonary arterial smooth muscle cells in hypoxia

HUANG Chun-ji, ZHOU De-shan, ZHANG Yu, QIAN Gui-sheng (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of hypoxia on the expression of interleukin-6 (IL-6) in cocultured pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC). **Methods** Rat PASMC were cocultured with rat lung microvascular endothelial cells, and randomly divided into 5 groups: normal group (N), 2 h hypoxia (H2), 6 h hypoxia (H6), 12 h hypoxia (H12), and 24 h hypoxia (H24). The expression level of IL-6 mRNA in PASMC was detected with RT-PCR, and the activity of IL-6 in the supernatant with radioimmunoassay. **Results** The expression level of IL-6 mRNA increased in PASMC in H2, reached the highest in H6, and decreased in H12, but still higher than that of N. The changes of the IL-6 activity in the supernatant as well as IL-6 mRNA expression in the cells were in a time-dependent manner. **Conclusion** Hypoxia can enhance the expression of IL-6 in cocultured PASMC. And it may activate others genes which regulate the hypoxic response of PASMC and signal transduction.

Key words: hypoxia; coculture; pulmonary artery; smooth muscle cells; interleukin-6

肺动脉平滑肌细胞(Pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMC)的异常增生、迁移和凋亡是肺血管重建、肺动脉高压和慢性阻塞性肺病等的肺动脉改变的主要细胞学基础[1]。既往研究表明,低氧通过调节[Ca^{2+}]、cGMP系统影响细胞的生长状况,参与这些疾病的病理进展[2]。白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)是功能最为广泛的细胞因子之一,它可以促进多种细胞的增殖和分化,在神经、呼吸、内分泌等多种系统中发挥一定的生物学效应。本研究观察低氧状况下肺动脉平滑肌细胞中IL-6基因表达状况,为探讨IL-6等细胞因子及其相关信号系统在细胞低氧损伤中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

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),Tripure分离试剂,PCR产物纯化试剂盒(Roche公司),MMLV逆转录酶,Oligo$(dT)_{15}$,RNA酶抑制剂(Promega公司),*Taq* DNA酶,$dNTP_X$(上海博亚公司),抗人IL-6试剂盒(北京东亚免疫公

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970329);第三军医大学基础部科研经费资助项目(2000)
作者简介:黄春基(1972-),男,广东省龙川县人,硕士,主治医师,讲师,主要从事呼吸道感染等疾病的分子生物学和微生物学方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68755320
通信作者:钱桂生,电话:(023)68755603;E-mail:gsqian2002@yahoo.com.cn
收稿日期:2002-03-20;修回日期:2002-09-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

司)。PTC-200 DNA 扩增仪(MT Research 公司, USA), SX-100 凝胶成像分析系统(上海四星公司)。其它试剂为国产分析纯。

1.2　细胞培养

大鼠 PASMC 系的培养和鉴定, 采用复合胶原酶法[4]。大鼠肺微血管内皮细胞(Pulmonary microvascular endothelial cells, PMVEC)系的培养, 见文献[5]。

1.3　细胞的复合培养和低氧培养

采用套皿法进行复合培养, 即先将 PMVEC 种植于滤膜上, PASMC 培养在 6 孔板上, 然后将二者套接在一起进行培养[6]。利用自制的缺氧小室, 将已配好的低氧气体置换进容器内[7]。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。

1.4　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。

1.5　逆转录 PCR

采用 Tripure 试剂一步法提取细胞总 RNA, 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定, 紫外分光光度计测定纯度并定量。根据 Genebank 提供的 mRNA 序列, 应用引物设计软件自行设计 IL-6 上游序列为 5′-GAC TGA TGT TGT TGA CAG CCA CTG C-3′, 下游序列为 5′-TAG CCA CTC CTT CTG TGA CTC TAA CT-3′, 阳性对照 HPRT 引物参见文献[8], 上游序列为 5′-GCT GGT GAA AAG GAC CTC TCG-3′, 下游序列为 5′-GCA GAT GGC CAC AGG ACT AGA-3′。先将 RNA 逆转录为 cDNA, 再进行 PCR 扩增。扩增条件为 95 ℃ 2 min, 1 循环; 94 ℃1 min, 55 ℃1 min, 72 ℃ 2 min, 进行 35 循环; 再 72 ℃延伸 10 min。最后取 4 μl 产物电泳后, 保存在计算机里, 进行图像分析, 与阳性对照 HPRT 比较, 进行半定量分析。以目的片段与 HPRT 的光密度比值作为目的片段 mRNA的相对含量。

1.6　IL-6 活性测定

根据试剂盒的要求操作, 加水或 PBS 溶解试剂, 取出预先准备好的细胞上清液标本(5 倍浓缩), 依次加入相关试剂, 最后用 γ 计数仪测定。

1.7　统计学分析

所有结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 程序进行 F 检验和 q 检验。

2　结果

2.1　低氧时复合培养的肺动脉平滑肌细胞 IL-6 基因的表达状况

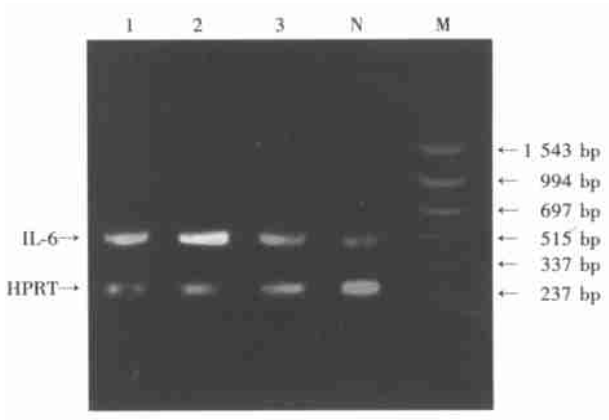
复合培养的 PASMC 在正常状况下表达 IL-6 基因, 低氧 2 h 时明显升高, 低氧 6 h 时表达至高峰, 12 h 已有降低, 仍明显高于低氧 2 h 的表达水平。单独培养组高于复合培养组。见表 1, 图 1。

表 1　低氧对 PASMC 表达 IL-6 mRNA 的影响(n=4, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of hypoxia on IL-6 mRNA expression in cocultured PASMC under hypoxia (n=4, $\bar{x}\pm s$)

	N	H2	H6	H12
Homotypic	0.67±0.07△	1.75±0.09*▼△	2.25±0.12*△	1.86±0.10*▼△
Coculture	0.37±0.07	0.84±0.08*▼	1.18±0.11*	0.95±0.09*▼

*: P<0.01 *vs* N group; ▼: P<0.01 *vs* H6 group; △: P<0.01 *vs* Coculture group



1—3: Hypoxia for 2, 6 and 12 h respectively; N: Normal control; M: PCR marker

图 1　低氧对 PASMC 表达 IL-6 mRNA 的影响

Fig 1　Effect of hypoxia on IL-6 mRNA expression

2.2　低氧时复合培养的肺动脉平滑肌细胞 IL-6 活性的变化

低氧处理单独培养和复合培养的 PASMC 后 IL-6 活性的变化情况见表 2。

表 2 示, 复合培养的 PASMC 在低氧 2 h 时 IL-6 活性升高, 低氧 6 h 时 IL-6 活性表达最高, 24 h 明显降低, 但高于常氧的水平。单独培养组的水平高于复合培养组。

表 2　低氧时 PASMC 上清液中 IL-6 活性的变化(n=4, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of IL-6 activity in the supernatant fluid of cocultured PASMC under hypoxia (n=4, $\bar{x}\pm s$)

	N	H2	H6	H12	H24
Homotypic	91.34±15.22△	226.86±26.31*▼△	613.52±43.37*△	389.91±29.64*▼△	243.52±23.18*▼△
Coculture	78.49±16.37	200.68±23.55*▼	485.32±39.91*	342.26±33.25*▼	176.53±19.64*▼

*: P<0.01 *vs* N group; ▼: P<0.01 *vs* H group; △: P<0.01 *vs* Coculture group

3　讨论

IL-6 是由 184 个氨基酸残基构成的糖蛋白, 分子量为 21×10^3, 人和鼠 IL-6 氨基酸序列有 65% 的同源性, 人 IL-6 基因定位于第 7 号染色体上。IL-6 在体内可由多种细胞产生, 是属于促红细胞生成素超家族成员, 其分布无严格的细胞特异性, 广泛表达于淋巴细胞和非淋巴细胞, 如 T 细胞、成纤维细胞、单核细胞、巨核

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

细胞和内皮细胞等表面。其广泛分布提示 IL-6 作用的靶细胞种类繁多，因而在细胞因子网络中发挥多种生物学效应，如免疫调节、刺激生血、防御作用、急性期反应等。1988 年 IL-6 受体的 cDNA 被克隆，其全长约 5.0 kb，编码 467 个氨基酸的跨膜糖蛋白。其中有 6 个 N-糖基化位点，1 个在胞浆内，另 5 个在胞膜外。跨膜区和胞浆内区分别由 28 个和 82 个氨基酸组成。胞膜外区由两个串联的纤维连接蛋白 3 型结构区、IG 样区和疏水肽组成。IL-6 受体系统由 80×10^3 的 IL-6R 和一个不能与 IL-6 结合的 130×10^3 的信号传导子(gp130)组成。应该说 IL-6 及其受体的结构已经清楚，需要深入研究其功能。

目前缺氧对复合培养的平滑肌细胞作用后，研究 IL-6 基因表达及其变化的文献还甚少，我们首次报道缺氧作用 2 h 后 IL-6 基因在复合培养的 PASMC 中就有明显升高，6 h 达高峰，12 h 有所降低，但仍明显高于正常水平。表明缺氧可以明确促进 IL-6 基因在 PASMC 的表达。既往有文献研究，在动物模型中，低氧诱导不同的生长因子、细胞因子和前炎症介质的表达，包括血小板源性生长因子(Platelet-derived growth factor，PDGF)的表达、IL-6、IL-8 和血小板活化因子(Platelet-activating factor，PAF)。低氧处理人肺成纤维细胞和 VSMC 后，可使细胞表达 IL-6 升高 4～5 倍，IL8 升高 5～6 倍[9]。在常氧条件下，PAF 和 PDGF 诱导人肺成纤维细胞和 VSMC 表达 IL-6 和 IL-8，低氧作用时，PAF 和 PDGF 仍发挥调节作用[9]。VSMC 可自身分泌 IL-6，精氨酸加压素对其分泌物有明显的抑制作用，且作用时间愈长，抑制作用愈显著[10]。此外文献[11]报道提示，低密度脂蛋白刺激人 VSMC 表达 gp130，从而分泌 IL-6。5-羟色胺促进人血管平滑肌细胞表达 IL-6[12]。补体复合物 C5b-9 刺激人平滑肌细胞表达 IL-6[13]。抗氧化剂抑制血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor，VEGF)诱导的 NF-KB 的激活、IL-6 的表达和细胞迁移[14]。过氧化物酶体增生物激活受体在血管内皮细胞、平滑肌细胞、单核细胞和巨噬细胞中抑制 IL-6、COX2、ET1 的表达[15]。说明，IL-6 的分泌和抑制是复杂的，细胞因子之间、细胞因子与其它因子之间存在相互作用。

低氧状况下 PASMC 中 IL-6 明显升高，有可能通过激活 MAPK、信号传导与转录活化因子等多种信号途径，参与低氧肺动脉高压、血管性疾病的发病机制。详细作用途径在进一步研究之中。

参考文献：

[1] 钱桂生，吴国明. 肺心病的诊断与治疗[M]. 北京：人民军医出版社，1999. 17－61.

[2] 王关嵩，钱桂生，杨晓静. 一氧化碳对肺动脉平滑肌细胞[Ca^{2+}]、cAMP、cGMP 的作用[J]. 第三军医大学学报，2000，22(5)：417－419.

[3] Seki Y，Kai H，Shibata R，*et al*. Role of the IL－6/STAT pathway in rat carotid artery remodeling after vascular injury[J]. Circ Res，2000，87(1)：12－18.

[4] 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.

[5] 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.

[6] 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.

[7] 王关嵩，钱桂生，陈维中，等. 低浓度 CO 和低氧气体处理培养细胞的容器的研制及其应用[J]. 中国动脉硬化杂志，2001，16(1)：46－50.

[8] Osawa M，Handa K I，Hamada H，*et al*. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell[J]. Science，1996，273(12)：242－245.

[9] Tamm M，Bihl M，Eickelberg O，*et al*. Hypoxia-induced interleukin-6 and interleukin-8 production is mediated by platelet-activating factor and platelet-derived growth factor in primary human lung cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol，1998，19(4)：653－661.

[10] 宋开梅，赵连友，徐辉. 精氨酸加压素促血管平滑肌细胞增殖效应及其对 IL－6 分泌的影响[J]. 中华心血管病杂志，1994，22(4)：293－296.

[11] Klouche M，Rose John S，Schmiedt W，*et al*. Enzymatically degraded，nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation，foam cell transformation，and proliferation[J]. Circulation，2000，101(15)：1799－1805.

[12] Ito T，Ikeda U，Shimpo M，*et al*. Serotonin increases interleukin-6 synthesis in human vascular smooth muscle cells[J]. Circulation，2000，102(20)：2522－2527.

[13] Viedt C，Hansch G M，Brandes R P，*et al*. The terminal complement complex C5b-9 stimulates interleukin-6 production in human smooth muscle cells through activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1[J]. FASEB J，2000，14(15)：2370－2372.

[14] Wang Z，Castresana M R，Newman W H. Reactive oxygen and NF-kappaB in VEGF-induced migration of human vascular smooth muscle cells[J]. Biochem Biophys Res Commun，2001，285(3)：669－674.

[15] Neve B P，Fruchart J C，Staels B. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis[J]. Biochem Pharmacol，2000，60(8)：1245－1250.

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net