

· 基础研究 ·

瘦素对大鼠气道平滑肌细胞凋亡的影响

倪文静, 朱述阳[△], 刘文静, 吴 瑕, 陈云峰, 赵 玲

(徐州医学院附属医院呼吸科, 江苏徐州 221002)

摘要:目的 探讨瘦素对大鼠气道平滑肌细胞(ASMCs)凋亡的影响。方法 体外培养大鼠 ASMCs。Western blot 法测定 ASMCs 上瘦素受体的表达。不同浓度(0、20、40、60、80、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的瘦素及 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 瘦素+BY-0961Rleptin receptor(L)干预培养的大鼠 ASMCs 48 h 后, Annexin V-FITC/PC 测定细胞凋亡率, Western blot 法测定半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspase-3)和 B 细胞淋巴瘤/白血病-x1(Bcl-x1)蛋白表达。结果 ASMCs 上有瘦素受体的表达; 细胞的凋亡率与瘦素浓度呈负相关; 瘦素对 ASMCs 抗凋亡作用与浓度呈正相关, caspase-3 表达减少, Bcl-x1 表达增加。结论 大鼠 ASMCs 表面有瘦素受体的表达。瘦素可以抑制体外培养的大鼠 ASMCs 的凋亡, 且这种作用呈浓度依赖性。

关键词:瘦素; 肌细胞, 平滑肌; 气管; 细胞凋亡; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3; Bcl-X 蛋白质; 大鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.31.021

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)31-3295-03

The apoptosis effect of leptin on rat's airway smooth muscle cells

Ni Wenjing, Zhu Shuyang[△], Liu Wenjing, Wu Xia, Chen Yunfeng, Zhao Ling

(Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: Objective To study the apoptosis effect of leptin on rat's airway smooth cells(ASMCs). Methods Rat ASMCs were derived from rat airway tissue and then cultured *in vitro*. ASMCs were stimulated with the different concentrations of leptin(0, 20, 40, 60, 80, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of leptin and BY-0961Rleptin receptor(L) for 48 h. After that, the rates of cell apoptosis were detected by flow cytometry, respectively. The protein expression of caspase-3 and Bcl-x1 were measured by Western blot respectively. Results There was the expression of leptin receptor on ASMCs; There was negative correlation between cell apoptosis and different concentrations of leptin; Leptin could inhibit the apoptosis of ASMCs at 48 h with different concentrations and inhibit the express of caspase-3, and increase the express of Bcl-x1. These anti-apoptosis effects of leptin had positive correlation with the concentrations of it. Conclusion There were leptin receptors on the rats ASMCs. Leptin can inhibit the apoptosis of ASMCs *in vitro* through the combination with leptin receptors.

Key words: leptin; myocytes, smooth muscle; trachea; apoptosis; caspase-3; Bcl-X protein; rats

瘦素, 为一种相对分子质量为 16×10^3 的激素, 主要由脂肪细胞分泌, 在免疫系统和炎症中起着多方面的作用^[1]。瘦素与瘦素受体(OB-R)结合通过激活磷脂酰肌醇-3-OH 激酶和分裂素活化的蛋白激酶(MAPK)信号通路发挥其作用^[2]。瘦素浓度在过敏性气道中是增加的, 可能在肥胖和哮喘的关系中起着作用^[3]。但瘦素与瘦素受体的作用通路及发病机制在哮喘患者的气道中的作用仍不清楚。最新研究证实瘦素可能在促进气道炎症的同时, 参与了哮喘的气道重构过程, 瘦素失衡可能是肥胖哮喘小鼠气道损伤和重建的重要因素^[4]。本小组前期研究表明瘦素可以促进体外培养的大鼠气道平滑肌细胞(airway smooth cells, ASMCs)的增殖^[5], 但是瘦素对 ASMCs 凋亡的影响尚无相关报道。本实验研究目的旨在探讨瘦素是否可通过与 ASMCs 上瘦素受体的结合来抑制细胞的凋亡, 从而可以进一步的了解瘦素对 ASMCs 的作用。

1 材料与方

1.1 材料 实验动物: 150~200 g SD 雌性大鼠 2 只由徐州医学院实验动物中心提供。主要试剂与仪器: 细胞培养基(DMEM)购自 Gibco 公司; 瘦素购自 Alexis 公司; 兔抗鼠瘦素受体的抗体 BY-0961Rleptin receptor(L)购自上海博华生物科技有限公司; 兔抗大鼠白血病-x1(Bcl-x1)抗体、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(caspase-3)抗体购自北京中杉公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物技术有限公司。

氨基酸蛋白酶 3(caspase-3)抗体购自北京中杉公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 ASMCs 的培养 水合氯醛麻醉大鼠后, 在无菌下剖取气管约 1.5 cm 放入超净台, 将气管段剪成 1 mm \times 1 mm 的组织块, 贴于培养瓶的侧面, 加入含 25% 胎牛血清(FBS)的培养液 2 mL 于瓶内, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 含 5% CO_2 培养箱静置, 3~4 h 之后轻轻翻转培养瓶, 半开放式于培养箱中培养。3 d 后, 添加 3 mL 的培养液于瓶内, 培养约 6 d 可换液, 此后每 3 天换液 1 次。待细胞长满瓶壁后传代培养, 选第 4~6 代的细胞用于实验。

1.2.2 细胞鉴定 (1)细胞形态学: 倒置显微镜观察细胞的大小、形态及排列方式等; (2)免疫荧光染色法: 把收集好的细胞加入消毒好的 6 孔培养板内, DMEM 补齐至 2 mL。倒置显微镜下观察细胞融合约 50%~60% 时取出玻片, 加 3.7% 甲醛液在室温下固定 30 min, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次, 每次 5 min, 用 0.1% 山羊血清封闭特异性抗原 30 min, 抗 SMC- α -actin(1:200 PBS 稀释)室温孵育细胞 2 h 后, 加入荧光标记二抗(1:200 PBS 稀释)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 第 2 天用荧光封片剂封闭后在荧光显微镜下检测。

1.2.3 Western blot 法检测瘦素受体蛋白 (1)分别提取未经瘦素干预和瘦素干预后的 ASMCs 蛋白备用。(2)用咪甲酰胺(BCA)蛋白实验法测量蛋白的浓度,配胶后,在每个上样孔中加入 30 μ L 的蛋白提取液,电压 80 V 电泳,电流 40 mA 转膜。然后把纤维膜取出,放入 30 g/L 的封闭液中封闭 3 h,按一抗:洗涤缓冲液(Washing Buffer):30 g/L 牛血清蛋白(BSA)=3:2:1 加入二抗,孵育 2 h,配制显色液,缓冲液(AP Buffer):四氮唑蓝(NBT):甲苯胺蓝(BCIP)=10 mL:66 μ L:33 μ L,加入显色液约 2 h,用 NBT/BCIP 显色后用 Image J 软件分析条带的灰度。

1.2.4 Western blot 法测定 caspase-3 和 Bcl-xl 蛋白的表达方法同上。封闭后,用 washing Buffer 洗涤 3 次,分别放入含 10% 的 caspase-3 和 Bcl-xl 抗体孵育,2 h 后配制显色液按上述方法显色后观察结果。用 NBT/BCIP 显色后用 Image J 软件分析条带的灰度值,计算 Bcl-xl/ β -actin 和 caspase-3/ β -actin 的比值。

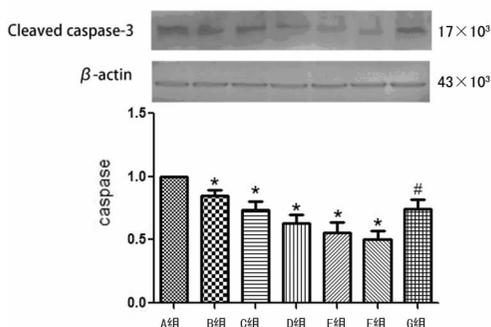
1.2.5 Annexin V-FITC/PI 测定细胞凋亡率 将第四代的 ASMCs 按 1×10^5 /孔接种于 4 个 6 孔板培养 24 h,再加入纯的 DMEM 培养 24 h,换 1% 含血清的 DMEM,随机分为 7 组:空白对照组(A组);20 μ g/mL 瘦素组(B组);40 μ g/mL 瘦素组(C组);60 μ g/mL 瘦素组(D组);80 μ g/mL 瘦素组(E组);100 μ g/mL 瘦素组(F组);100 μ g/mL 瘦素+BY-0961RLeptin receptor 组(G组)。将细胞置于培养箱中培养 48 h 后,用胰酶消化收集细胞离心 5 min。弃上清液后转移至标记好的 EP 管中。每管中加入 Annexin V-FITC 轻轻重悬细胞,加入 PI 避光反应 10 min,随即用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3 统计学处理 数据采用 SPSS13.0 统计软件分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析和 q 检验。相关性分析采用 Pearson 等级相关进行统计分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ASMCs 的鉴定 倒置显微镜放大 100 倍,细胞呈长梭形,贴壁平行生长,束状排列,密集与稀疏处相互交错(封 4 图 1A)。免疫荧光染色法证明:抗平滑肌肌动蛋白抗体呈阳性染色的细胞内可见大量的绿色荧光,说明所培养的细胞为 ASMCs(封 4 图 1B)。

2.2 瘦素受体的鉴定 Western blot 法显示在相对分子质量 $(95 \sim 130) \times 10^3$ 之间有明显的条带。见封 4 图 2。



*: $P < 0.05$, 与 A 组比较; #: $P < 0.05$, 与 F 组比较。

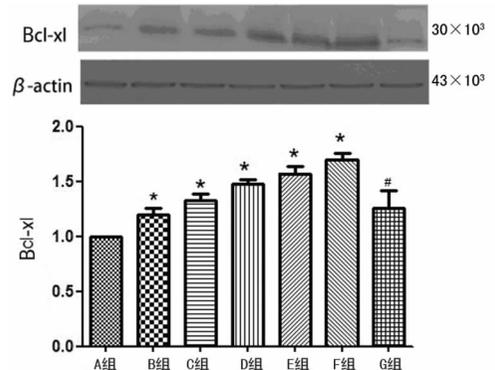
图 3 Western blot 检测各组裂解的 caspase-3 蛋白的表达

2.3 瘦素对 ASMCs 凋亡的影响 瘦素分别作用于 ASMCs

48 h 后,用流式细胞仪检测各组的凋亡率,B、C、D、E、F 组细胞的凋亡率分别为 $(5.16 \pm 0.99)\%$ 、 $(3.45 \pm 0.82)\%$ 、 $(2.90 \pm 0.18)\%$ 、 $(1.68 \pm 0.87)\%$ 、 $(1.08 \pm 0.26)\%$ 均低于 A 组 $(6.48 \pm 0.76)\%$ ($P < 0.05$),且各组细胞凋亡率与瘦素浓度呈负相关($r = -0.992$, $P < 0.01$),加入瘦素受体抗体的 G 组细胞的凋亡率为 $(3.12 \pm 0.76)\%$,较 F 组明显升高($P < 0.05$)。

2.4 瘦素对 caspase-3 表达的影响 Western blot 表明不同浓度瘦素处理后,ASMCs 内裂解的 caspase-3 表达减少,并与浓度呈负相关($r = -0.932$, $P < 0.01$),见图 3。

2.5 瘦素对 ASMCs 内 Bcl-xl 蛋白的影响 Western blot 结果显示随着瘦素浓度的增加,对抑制细胞凋亡的 Bcl-xl 蛋白的表达逐渐增多,且与浓度呈正相关($r = 0.974$, $P < 0.01$),见图 4。



*: $P < 0.05$, 与 A 组比较; #: $P < 0.05$, 与 F 组比较。

图 4 Western blot 检测各组 Bcl-xl 蛋白的表达

3 讨论

在过去的几年中,许多的研究证实了瘦素在呼吸系统中潜在作用。基于这样的研究,研究者们试图证明瘦素在特殊的呼吸系统紊乱中的作用,包括慢性阻塞性肺疾病(COPD)、哮喘、肺癌。本研究证明了瘦素与瘦素受体结合抑制了大鼠 ASMCs 的凋亡,瘦素可以使参与细胞凋亡的蛋白 caspase-3 表达减少,使抑制细胞凋亡的蛋白 Bcl-xl 表达减少。其中瘦素抑制 ASMCs 凋亡的作用机制尚在研究之中。

瘦素可以通过 STAT-3 的活化途径体外刺激人的单核细胞增殖^[6]。而且最近一篇文献已经证明了瘦素受体在大鼠 ASMCs 上有表达,瘦素与瘦素受体结合可体外刺激大鼠 ASMCs 的增殖^[5],这说明它可能在哮喘 ASMCs 增殖中起着一定的作用。本实验也证实了瘦素受体在大鼠 ASMCs 中有表达。而且肺组织中有瘦素受体基因的表达;在一些动物模型实验中也发现了肺组织上的瘦素受体^[7],更重要的是,有研究发现了肺组织细胞中有瘦素受体 b 型(OB-R b)的表达^[8],本实验 Western blot 显示在 95×10^3 与 130×10^3 之间有明显条带,与瘦素受体 OB-R b 120×10^3 的相对分子质量相符。说明 ASMCs 上有长型瘦素受体的表达。

有研究表明瘦素可以避免 T 淋巴细胞凋亡,调节 T-Cell 的增殖和活化,并促进血管的生成^[9]。哮喘是以气道重塑为主的慢性气道炎症,主要表现为气道内上皮细胞的脱落、基底膜的增厚等,且有研究证实了瘦素本身不促进平滑肌的增殖、迁移或细胞因子的合成,这说明了肥胖对哮喘的影响不能归因于瘦素直接对 ASMCs 的作用^[10]。

有研究证实了瘦素可以通过激活 p-ERK 和 PI-3K 的机制体外促进大鼠 ASMCs 细胞的增殖^[5],而对大鼠 ASMCs 细胞

的凋亡率的影响却没有相关的研究。本实验用不同浓度的瘦素体外刺激大鼠 ASMCs 48 h 后,用流式细胞仪检测法和 Western blot 法来观察瘦素对细胞凋亡的影响;结果显示了瘦素可与 ASM 细胞膜上的瘦素受体结合通过相应的作用机制及相应的信号转导体系而实现抑制细胞的凋亡,导致裂解的 caspase-3 的减少,Bcl-xl 的增加,并具有明显的浓度依赖性,于 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时达到高峰,当在 F 组中加入 BY-0961RLeptin receptor 后,实验发现 ASMCs 的凋亡率明显升高,从而证实了 BY-0961RLeptin receptor 可通过与受体结合抑制瘦素对细胞的抗凋亡作用。瘦素也可以保护心肌细胞免受缺氧-再灌注或是过氧化氢诱导的凋亡^[11],说明瘦素在细胞保护中可能起着重要的作用。

caspase 家族在细胞凋亡中起着至关重要的作用,caspase-3 在凋亡过程中起着重要的作用,细胞凋亡的过程是 caspase-3 不可逆水解底物的级联放大反应过程^[12],它可直接破坏细胞结构,在细胞发生凋亡时,核纤层蛋白可被 caspase-3 在一个近中部的固定部位所裂解,使核纤层蛋白崩解,导致细胞凋亡。本研究发现,与对照组相比,不同浓度的瘦素干预 ASMCs 后,可使裂解的 caspase-3 蛋白表达明显增多,且与瘦素浓度呈负相关,说明 caspase-3 参与瘦素对 ASMCs 的凋亡作用。

Bcl-xl 蛋白是 BCL 蛋白家族的成员之一,是细胞中抑制细胞凋亡的重要分子之一,Bcl-xl 是结构上与 Bcl-2 具有 43% 同源性的蛋白与 Bcl-2 的作用相同,可抑制细胞凋亡。Bcl-xl 的过度表达可引起细胞核谷胱甘肽(GSH)的积聚,导致核内氧化还原平衡的改变,从而降低 caspase-3 酶的活性。本研究发现不同浓度的瘦素可以通过增加 Bcl-xl 蛋白的表达使 caspase-3 蛋白减少且与瘦素浓度呈正相关($P < 0.01$)。当加入瘦素受体抑制剂时,caspase-3 蛋白的表达明显增多,Bcl-xl 蛋白表达明显减少。这说明了二者在瘦素对 ASMCs 的抑制凋亡作用中发挥重要的作用,共同参与细胞的凋亡过程。

总之,瘦素可以在体外与大鼠 ASMCs 的瘦素受体结合,增加 Bcl-xl 的表达,抑制裂解 caspase-3 的表达,从而实现了 ASMCs 的保护。其中的作用机制尚不清楚,可能是 PI-3K 和 MAPK 通路发挥其作用,这有待进一步的研究来证实。

参考文献:

[1] Matarese G, Mantzoros C, La Cava A. Leptin and adipocytokines: bridging the gap between immunity and athero-

sclerosis[J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(36): 3676-80.

- [2] Conus S, Bruno A, Simon HU. Leptin is an eosinophil survival factor[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 116(6): 1228-1234.
- [3] Shore SA, Schwartzman IM, Mellema MS, et al. Effect of leptin on allergic airway responses in mice[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2005, 115(1): 103-109.
- [4] 苏毅,王欣,唐彩月,等.瘦素在肥胖哮喘小鼠气道重构中的作用[J]. *实用临床医药杂志*, 2010, 14(7): 6-9.
- [5] 何淑敏,朱述阳,李慧婷,等.瘦素对大鼠气道平滑肌细胞增殖的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(8): 849-855.
- [6] Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS. Leptin in immunology[J]. *J Immunol*, 2005, 174(6): 3137-3142.
- [7] Hoggard N, Trahum P, Mecer JG. Leptin and leptin receptor mRNA and Proteins expression in the murine foetus and placenta[J]. *Proc Natl Acad Science USA*, 1997, 94(20): 11073-11078.
- [8] Bruno A, Pace E, chain P, et al. Leptin receptor expression in asthma[J]. *J Allergy Clin Immune*, 2009, 124(21): 230-237.
- [9] Hersoug LG, Linneberg A. The link between the epidemics of obesity and allergic disease: does obesity induce decreased immune tolerance? [J]. *Allergy*, 2007, 62(10): 1205-1213.
- [10] Nair P, Radford K, Fanat A, et al. The effects of leptin on airway smooth muscle responses[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 39(4): 475-481.
- [11] Shin EJ, Schram K, Zheng XL, et al. Leptin attenuates hypoxia/reoxygenation-induced activation of the intrinsic pathway of apoptosis in rat H9c2 cells[J]. *J Cell Physiol*, 2009, 221(2): 490-497.
- [12] Lakhani SA, Masud A, Kuida K, et al. caspase 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis[J]. *Science*, 2006, 311(5762): 847-851.

(收稿日期:2012-03-24 修回日期:2012-06-29)

(上接第 3294 页)

Res, 2002, 68(3): 315-322.

- [12] Wang CX, Olschowka JA, Wrathall JR. Increase of interleukin-1beta mRNA and protein in the spinal cord following experimental traumatic injury in the rat[J]. *Brain Res*, 1997, 759(2): 190-196.
- [13] Nestic O, Xu GY, McAdoo D, et al. IL-1 receptor antagonist prevents apoptosis and caspase-3 activation after spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2001, 18(9): 947-956.
- [14] Hall ED. Inhibition of lipid peroxidation in CNS trauma [J]. *J Neurotrauma*, 1991, 8(1): 31-40.

[15] Hall ED. Lipid antioxidants in acute central nervous system injury[J]. *Ann Emerg Med*, 1993, 22(6): 1022-1027.

[16] 郑望苟,潘卫红,陈家禄.脊髓损伤后脊髓内丙二醛含量变化及其与神经功能损害的关系[J]. *中国康复医学杂志*, 2004, 19(2): 103-104.

[17] Gimenez Ribotta M, Menet V, Privat A. The role of astrocytes in axonal regeneration in the mammalian CNS [J]. *Prog Brain Res*, 2001(132): 587-610.

(收稿日期:2012-03-02 修回日期:2012-06-28)