

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.04.010

Slit2 蛋白对 TNF- α 诱导的大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞增殖迁移的影响

刘丽华¹, 刘涛^{2 Δ} , 王浩宇², 陈桂秀², 倪伟², 邓学云³

(1. 川北医学院第二临床医学院/四川省南充市中心医院; 1. 老年病科; 2. 心内科; 3. 神经外科 637000)

摘要:目的 观察 Slit2 蛋白对大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖迁移的影响。方法 采用川北医学院第二临床医学院实验室培养的大鼠 VSMCs, 实验分两部分, 第一部分: Slit2 单独作用, 分为正常对照组和实验组(Slit2 蛋白浓度分别为: 50、75、100、125、150 ng/mL); 第二部分: Slit2 与 TNF- α 共同作用, 分为正常对照组、阳性对照组(含 TNF- α 10 ng/mL)和实验组(TNF- α 10 ng/mL+Slit2 50 ng/mL, TNF- α 10 ng/mL+Slit2 75 ng/mL, TNF- α 10 ng/mL+Slit2 100 ng/mL, TNF- α 10 ng/mL+Slit2 125 ng/mL, TNF- α 10 ng/mL+Slit2 150 ng/mL)。分别采用 CCK-8 及 transwell 小室法检测各组细胞的增殖及迁移能力。**结果** 第一部分: 实验组与对照组 OD 值及迁移细胞数目比较差异均无统计学意义($P=0.516, P=0.52$)。第二部分: 正常对照组与阳性对照组比较细胞迁移数目差异有统计学意义($P=0.00$), 实验组细胞迁移数较阳性对照组明显减少; CCK-8 结果显示实验组和阳性对照组与正常对照组 OD 值比较差异有统计学意义($P<0.05$), 而实验组与阳性对照组 OD 值比较差异无统计学意义($P=0.173$)。**结论** Slit2 对 VSMCs 增殖无影响, 但能抑制 TNF- α 诱导的 VSMCs 迁移。

关键词: 肿瘤坏死因子 α ; Slit2 蛋白; 血管平滑肌; 细胞增殖; 细胞运动

中图分类号: R329.21

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2015)04-0462-03

The effects of Slit2 protein on proliferation and migration of rats vascular smooth muscle cells stimulated by TNF- α

Liu Lihua¹, Liu Tao^{2 Δ} , Wang Haoyu², Chen Guixiu², Ni Wei², Deng Xueyun³

(1. Department of Geriatrics; 2. Department of Cardiology; 3. Department of Neurosurgery, Second Clinical School, North Sichuan Medical College Nanchong Central Hospital, Nanchong, Sichuan 637000, China)

Abstract: Objective To observe the effects of Slit2 protein on the proliferation and migration of VSMCs. **Methods** The VSMCs was cultured in our laboratory. The experiment was divided into two parts, part one: VSMCs were divided into normal control group and experimental groups(culture with 50, 75, 100, 125 and 150 ng/mL Slit2 respectively); part two: VSMCs were divided into normal control group, positive control group(culture with TNF- α 10 ng/mL) and experimental groups(culture with TNF- α 10 ng/mL+Slit2 50 ng/mL, TNF- α 10 ng/mL+Slit2 75ng/mL, TNF- α 10 ng/mL+Slit2 100 ng/mL, TNF- α 10 ng/mL+Slit2 125 ng/mL and TNF- α 10 ng/mL+Slit2 150 ng/mL respectively). To detect proliferation and migration of VSMCs by CCK-8 and transwell experiment. **Results** The difference of OD value and numbers of VSMCs has no statistical significance in the presence of Slit2 ($P=0.516, P=0.52$). The numbers of VSMCs has statistical significance between control and positive control groups($P=0.00$). The numbers of VSMCs in experimental groups were fewer than positive control group($P<0.05$), whereas the difference of OD value still has no statistical significance between experimental and positive groups ($P=0.173$). **Conclusion** Recombinant Slit2 could inhibits migration in VSMCs induced by TNF- α , whereas it has no effect on proliferation of VSMCs.

Key words: tumor necrosis tactor-alpha; Slit2 protein; muscle, smooth, vascular; cell proliferation; cell movement

平滑肌细胞从血管中膜迁移到内膜、增殖并分泌大量的细胞外基质在动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄中有重要作用^[1]。研究发现 Slit 家族成员之一 Slit2 蛋白能阻止血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)诱导的人主动脉平滑肌细胞(vascular smooth musle cells, HASMCs)迁移^[2]。TNF- α 与 PDGF 同属炎性反应产物, 在促进平滑肌细胞迁移的过程中, 二者能激活共同的、互补的信号传导机制^[3], 且在肿瘤细胞中 TNF- α 能引起 Slit2 蛋白表达增加^[4-5]。因此作者推测 Slit2 对 TNF- α 在 VSMCs 上的作用可能有影响, 并通过本研究进行论证。

1 材料与与方法

1.1 材料与仪器 大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞由川北医学

院组织工程干细胞研究所自行培养; DMEM 培养液/高糖、胎牛血清(FBS)购自 Hyclone 公司, 0.25% 胰蛋白酶购自 Invitrogen 公司, 青霉素、链霉素混合液购自 KeyGEN 公司, TNF- α 、重组大鼠 Slit2 购自 R&D 公司, CCK-8 溶液购自碧云天公司。倒置荧光显微镜(Nikon 公司), 自动酶标仪(Anthos 公司), transwell 小室(Millipore 公司)。

1.2 方法

1.2.1 Slit2 对血管平滑肌细胞增殖迁移的影响 (1)取对数生长期的 VSMCs, 以浓度 2×10^4 /mL 接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L 培养基, 放入 5% CO₂ 培养箱培养, 待细胞的贴壁融合率达 80% 左右时, 吸弃培养基。实验分为正常对照组和实验组, 正常对照组含有 20% FBS 的 DMEM 培养液; 实验组含有

20% FBS 的 DMEM 培养液及 Slit2 蛋白,使 Slit2 蛋白的浓度分别为 50、75、100、125、150 ng/mL。每组设 6 个复孔,孵育 24 h,实验终止前 1 h 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,继续培养 1 h 后,在 450 nm 波长处测定 OD 值。(2)取对数生长期的 VSMCs 以浓度 1×10^4 /孔的细胞悬液接种到 transwel 小室上室,向 transwel 小室下室 24 孔板中加入含 Slit2 蛋白的培养基 800 μL 分为正常对照组和实验组,正常对照组含有 20% FBS 的 DMEM 培养液;实验组含有 20% FBS 的 DMEM 培养液及 Slit2 蛋白,使 Slit2 蛋白的浓度分别为 50、75、100、125、150 ng/mL。于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后,使细胞迁移至基底膜下;取出小室,用棉签将滤膜上表面未迁移过去的细胞拭去,晾干小室,甲醇固定,0.1% 结晶紫染色,倒置显微镜下计数滤膜下细胞数目($\times 200$)。每张基底膜选取 9 个视野。

1.2.2 Slit2 对 TNF-α 诱导的血管平滑肌细胞增殖迁移的影响 实验分为正常对照组、阳性对照组和实验组,正常对照组不含 TNF-α 及 Slit2 蛋白;阳性对照组含 TNF-α 10 ng/mL;实验组分别含 TNF-α 10 ng/mL+Slit2 50 ng/mL, TNF-α 10 ng/mL+Slit2 75 ng/mL, TNF-α 10 ng/mL+Slit2 100 ng/mL, TNF-α 10 ng/mL+Slit2 125 ng/mL, TNF-α 10 ng/mL+Slit2 150 ng/mL。按照上述方法分别进行增殖及迁移实验。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间变量的差异使用单因素方差分析,组间比较用 LSD 和 SNK 法,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Slit2 对 VSMCs 增殖迁移的影响 对数生长期的 VSMCs,加入不同浓度的 Slit2 后,采用 CCK-8 法检测细胞增殖变化,分光光度计测得各组 OD 值变化,差异无统计学意义 ($P = 0.516$),见图 1;transwel 结果显示各实验组与对照组细胞迁移数目比较差异无统计学意义 ($P = 0.52$),见图 2。提示在 24 h 内 Slit2 蛋白(50~150 ng/mL)对 VSMCs 增殖迁移均没有明显作用。

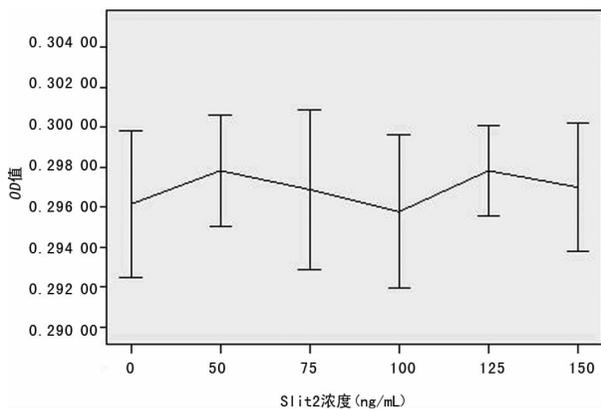


图 1 Slit2 对 VSMCs 增殖的影响

2.2 Slit2 对 TNF-α 诱导的 VSMCs 增殖迁移的影响 实验组和阳性对照组的 OD 值与正常对照组的 OD 值比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),而实验组与阳性对照组的 OD 值比较差异无统计学意义 ($P = 0.173$),提示 Slit2 对 10 ng/mL TNF-α 诱导的 VSMCs 增殖没有明显作用。transwel 结果显示实验组细胞数目较阳性对照组细胞数目明显减少。提示 Slit2(50

~150 ng/mL)能抑制 10 ng/mL TNF-α 诱导的 VSMCs 迁移,且其抑制作用有浓度依赖性,浓度越大,抑制作用越明显,当 Slit2 浓度达 125 ng/mL 时其抑制作用随浓度增加变化不再明显,见图 3~5。

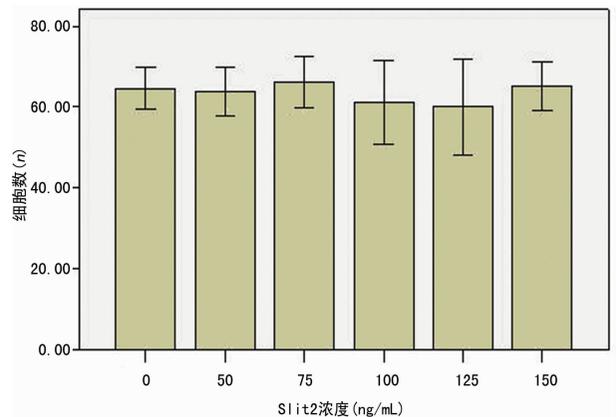
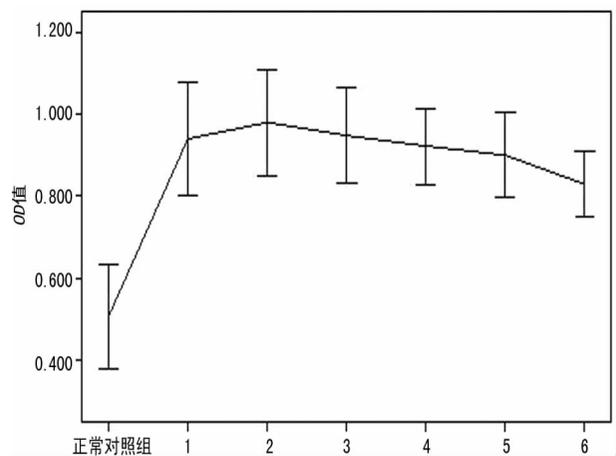
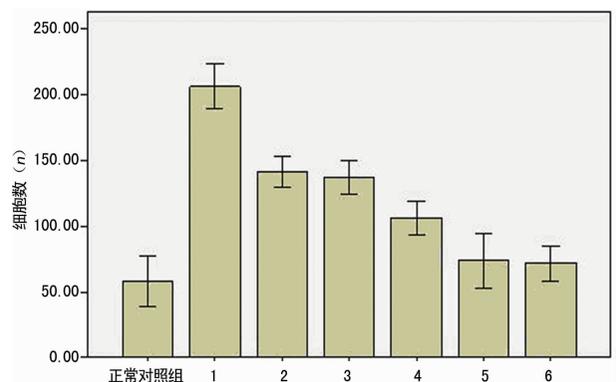


图 2 Slit2 对 VSMCs 迁移的影响 ($\bar{x} \pm s$, 个, $n = 9$)



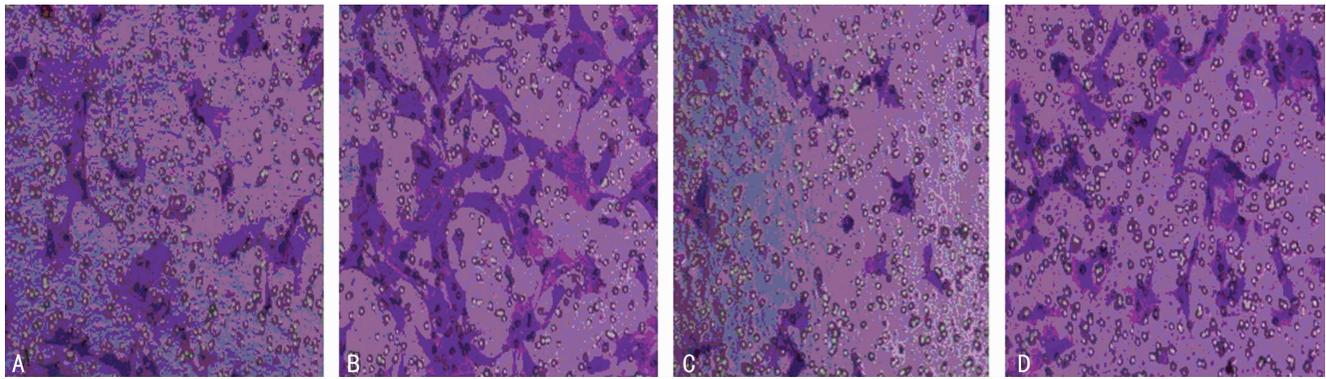
1: TNF-α 10 ng/mL; 2: TNF-α 10 ng/mL + Slit2 50 ng/mL; 3: TNF-α 10 ng/mL + Slit2 75 ng/mL; 4: TNF-α 10 ng/mL + Slit2 100 ng/mL; 5: TNF-α 10 ng/mL + Slit2 125 ng/mL; 6: TNF-α 10 ng/mL + Slit2 150 ng/mL。

图 3 Slit2 对 TNF-α 诱导的 VSMCs 增殖的影响



1: TNF-α 10 ng/mL; 2: TNF-α 10 ng/mL + Slit2 50 ng/mL; 3: TNF-α 10 ng/mL + Slit2 75 ng/mL; 4: TNF-α 10 ng/mL + Slit2 100 ng/mL; 5: TNF-α 10 ng/mL + Slit2 125 ng/mL; 6: TNF-α 10 ng/mL + Slit2 150 ng/mL。TNF-α Slit2 + 125 ng/mL 组与 TNF-α 100 ng/mL 组 + Slit2 150 ng/mL 组比较 $P = 0.73$; 其余各组组间比较 $P < 0.05$ 。

图 4 Slit2 对 TNF-α 诱导的 VSMCs 迁移的影响



A: 对照组; B: TNF- α 10 ng/mL; C: Slit2 100 ng/mL; D: TNF- α 10 ng/mL+Slit2 100 ng/mL 同时作用后。

图 5 Slit2 对平滑肌细胞迁移的影响($\times 200$)

3 讨论

Slit-Robo 信号通路能调控神经轴突导向、神经元迁移及白细胞趋化,还能调节内皮细胞及心内膜细胞的迁移,影响管腔形成及血管重建^[6-7]。在前期实验中,作者在 VSMCs 上检测到了 Slit2 的表达,且在 TNF- α 作用下 Slit2 的表达有变化,提示 Slit2 蛋白在 VSMCs 上可能有一定的作用。于是作者对 Slit2 蛋白在 VSMCs 上作用进行研究。研究结果显示:加入不同浓度的 Slit2 蛋白后各组细胞的 OD 值与对照组比较差异均无统计学意义($P>0.05$),提示 Slit2 对 VSMCs 的增殖没有明显作用。且在 10 ng/mL TNF- α 作用下,实验组 OD 值与 10 ng/mL TNF- α 组比较,差异仍无统计学意义($P>0.05$)。Liu 等^[2]通过细胞对胸腺嘧啶的摄入量来检测 DNA 合成,结果显示无论在有无 PDGF 状态下,Slit2-N/1118 对 VSMCs 的增殖均没有影响,与本研究结果一致。迁移实验中本研究观察到加入 Slit2 蛋白后,细胞迁移数目与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),提示 Slit2 蛋白对 VSMCs 迁移没有明显作用。但 10 ng/mL TNF- α + Slit2 组的细胞迁移数目比 10 ng/mL TNF- α 组明显减少,且表现出浓度依赖的特点,提示 Slit2 抑制了 TNF- α 诱导的细胞迁移。Ning 等^[8]在报道通过划痕法及改良 Boyden 小室法观察 Slit2 蛋白对气管平滑肌细胞的影响,发现在没有 PDGF 的状态下,Slit2 蛋白对细胞迁移没有明显作用;但当加入 PDGF 后,Slit2 对 PDGF 诱导的平滑肌细胞迁移表现出抑制效应。Liu 等^[2]也通过 transwell 小室法发现在没有 PDGF 的状态下外源性 Slit2 蛋白对 VSMCs 迁移没有影响;加入 PDGF 后,细胞板状伪足形成,细胞胞体延长,应力纤维减少甚至消失,细胞迁移增加;而 Slit2-N/1118 阻止板状伪足的形成,使细胞恢复到富含应力纤维的不规则形态,最终抑制了 PDGF 诱导的 VSMCs 的迁移^[2,8]。本研究发现,Slit2 能抑制 TNF- α 引起的内皮细胞通透性的改变^[9],从而抑制炎症反应。而 TNF- α 与 PDGF 均是炎症反应的产物,Slit2 对 TNF- α 和 PDGF 作用下的 VSMCs 的作用表明:Slit2 可能通过血管平滑肌细胞对血管炎性反应产生一定的作用。

细胞迁移是细胞骨架发生的协调性重建活动,包括肌动蛋白聚合,粘着斑形成,肌球蛋白收缩等复杂过程。而平滑肌细胞迁移的重要信号通路及效应蛋白有小 G 蛋白,磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinases,PI-3K),Rho 活化蛋白激酶(Rho activated protein kinase,ROCK),p21 活化蛋白激酶(p21-activated protein kinases,PAK)^[10],Src 家族酪氨酸激酶(Src family tyrosine kinases)和促分裂素原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases,MAPK)等^[11]。关于 Slit2 蛋白对 VSMCs 迁移的具体作用环节及效应蛋白目前还不清楚,仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] 魏本,郭富强. Periostin 与血管支架内再狭窄关系的研究进展[J]. 川北医学院学报,2012,27(3):313-317.
- [2] Liu D, Hou J, Hu X, et al. Neuronal chemorepellent slit2 inhibits vascular smooth muscle cell migration by suppressing small GTPase rac1 activation[J]. *Circ Res*,2006,98(4):480-489.
- [3] Poppel K, Zhang L, Orman ES, et al. Activation of vascular smooth muscle cells by TNF and PDGF: overlapping and complementary signal transduction mechanisms[J]. *Cardiovasc Res*,2005,65(3):674-682.
- [4] Wang B, Xiao Y, Ding BB, et al. Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity[J]. *Cancer Cell*,2003,4(1):19-29.
- [5] Biankin AV, Waddell N, Kassahn KS, et al. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes[J]. *Nature*,2012,491(7424):399-405.
- [6] Seth P, Lin Y, Hanai J, et al. Magic roundabout, a tumor endothelial marker: expression and signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2005,332(2):533-541.
- [7] Mommersteeg MT, Andrews WD, Ypsilanti AR, et al. Slit-roundabout signaling regulates the development of the cardiac systemic venous return and pericardium [J]. *Circ Res*,2013,112(3):465-475.
- [8] Ning Y, Sun Q, Dong Y, et al. Slit2-N inhibits PDGF-induced migration in rat airway smooth muscle cells; WASP and Arp2/3 involved [J]. *Toxicology*,2011,283(1):32-40.
- [9] London NR, Li DY. Robo4-dependent Slit signaling stabilizes the vasculature during pathologic angiogenesis and cytokine storm[J]. *Curr Opin Hematol*,2011,18(3):186-190.
- [10] Chang S, Song S, Lee J, et al. Phenotypic modulation of primary vascular smooth muscle cells by short-term culture on micropatterned substrate[J]. *PLoS One*,2014,9(2):1-10.
- [11] Gerthoffer WT. Migration of airway smooth muscle cells [J]. *Proc Am Thorac Soc*,2008,5(1):97-105.