

胃促生长素对人主动脉平滑肌细胞增殖及线粒体融合蛋白 2 表达的影响

何永铭¹, 宋明宝^{1△}, 胡建波¹, 张源萍¹, 李佑美¹

(第三军医大学新桥医院心血管内科, 重庆 400037)

[摘要] **目的** 通过体外培养人主动脉平滑肌细胞(HASMCs),研究胃促生长素(ghrelin)对血管平滑肌细胞(VSMC)增殖及线粒体融合蛋白 2(Mfn-2)表达的影响。**方法** 体外培养 HASMCs,第 4~6 代细胞用于试验。给予不同浓度(10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L)的 ghrelin 或 10^{-6} mol/L ghrelin 不同时间(0、6、12、18、24 h)处理,用四甲基偶氮唑蓝比色(MTT)法观察其对 HASMC 增殖的影响。RT-PCR,Western blot 方法检测不同处理方法对 Mfn-2 表达的影响。**结果** 10^{-7} ~ 10^{-5} mol/L 的 ghrelin 可明显抑制 HASMC 增殖,浓度为 10^{-6} mol/L 抑制作用最为明显($P<0.01$)。ghrelin 在 6~24 h 内均能明显抑制 HASMC 增殖,在 24 h 达最高峰($P<0.01$)。 10^{-6} mol/L ghrelin 能明显上调 Mfn-2 mRNA 和蛋白的表达($P<0.01$)。 10^{-6} mol/L ghrelin 在 18 h 上调 Mfn-2 mRNA 和蛋白表达的作用最为明显($P<0.01$)。**结论** ghrelin 可能通过上调 Mfn-2 的表达来抑制 HASMC 增殖。

[关键词] 胃促生长素;肌,平滑,血管;主动脉;人主动脉平滑肌细胞;增殖;线粒体融合蛋白-2

[中图分类号] R543.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)15-2034-03

Effect of ghrelin on proliferation and mitofusin-2 expression of human aortic smooth muscle cells

He Yongming¹, Song Mingbao^{1△}, Hu Jianbo¹, Zhang Yuanping¹, Li Youmei¹

(Department of Cardiology, Xinqiao Hospital of Third Medical Military University, Chongqing 400037, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of ghrelin on proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) and the expression of mitochondrial fusion 2 (Mfn-2) in cultured human aortic smooth muscle cells (HASMCs). **Methods** HASMCs were cultured in vitro, treated with different concentrations(10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} mol/L)ghrelin or 10^{-6} mol/L ghrelin for different time(0, 6, 12, 18, 24 h). Subconfluent HASMCs at passage 4-6 were used in experiments. MTT assay was used to investigate the effect on proliferation of HASMCs. RT-PCR and Western blot were used to analyse the expression of Mfn-2. **Results** 10^{-7} - 10^{-5} mol/L ghrelin inhibited the proliferation of HASMCs, and the inhibitory effect of concentration of 10^{-6} mol/L was the most obvious($P<0.01$). Ghrelin inhibited the proliferation of HASMCs in 6-24 h, and it reached the peak at 24 h($P<0.01$). 10^{-6} mol/L ghrelin significantly increased the expression of Mfn-2 mRNA and protein($P<0.01$). The up-regulation of 10^{-6} mol/L ghrelin on Mfn-2 mRNA and protein expression reached the peak at 18 h($P<0.01$). **Conclusion** Ghrelin might inhibit the proliferation of HASMC by up-regulating the expression of Mfn-2.

[Key words] ghrelin; muscle, smooth, vascular; aorta; human aortic smooth muscle cells; proliferation; mitofusin 2

血管平滑肌细胞(VSMC)增殖过度并向内膜下迁移是血管增殖性疾病的主要发病机制。胃促生长素(ghrelin)是 90 年代发现的生长激素促分泌素受体(GHSR)的内源性配体。研究发现,ghrelin 除具有促生长激素释放功能外,还具有心脏保护作用,抑制炎症反应及炎症相关的小鼠结肠癌变^[1-4],保护血管内皮功能^[5]等作用,而转录因子核转录因子 kappa B(NF- κ B)、Nkx2.2 可调控人类 ghrelin 的启动子活性^[6];还有研究发现,女性外周血中 ghrelin 的水平与颈动脉内膜的厚度呈负相关^[7-8],推测 ghrelin 可能对动脉再狭窄有抑制作用。线粒体融合蛋白 2(Mitofusin 2, Mfn-2)又命名为增殖抑制基因,它被发现于 1997 年,因能够抑制 VSMC 增殖而得名。Mfn-2 能抑制大鼠颈动脉球囊损伤后诱导的再狭窄^[9],而 Mfn-2 缺陷通过干扰细胞自噬来抑制细胞增殖^[10]。本文拟通过体外培养 HASMCs,研究 ghrelin 对 VSMC 增殖及 Mfn-2 表达的影响,探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 人主动脉平滑肌细胞(human aortic smooth muscle cells, HASMCs)购自美国 ScienCell 公司。

1.1.2 试验仪器 荧光倒置显微镜(Olympus 公司,美国),凝胶成像分析系统(UVP 公司,美国),酶联免疫检测仪(Bio-Rad 公司,美国),PCR 仪(Bio-Rad 公司,美国)。

1.1.3 试验试剂 ghrelin(Sigma 公司,美国),胎牛血清(ScienCell 公司,美国),SMCM 培养基(ScienCell 公司,美国),四甲基偶氮唑蓝比色(MTT)试剂盒(江苏碧云天生物公司);大鼠抗人 Mfn-2 单克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国),大鼠抗人 GAPDH 多克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国),辣根过氧化物酶标记的羊抗兔和羊抗鼠二抗(江苏碧云天生物公司);逆转录试剂盒、PCR 试剂盒(TAKARA 公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 HASMCs 培养及试验分组 HASMCs 在含 20.00% 胎牛血清的 SMCM 培养基中于 37℃、5.00%CO₂ 条件下培养,细胞生长达 80.00%融合后,用 0.25%胰蛋白酶消化,以 1:2 比例进行传代。取第 4~6 代呈对数生长的 HASMCs 细

胞接种于培养瓶中,待细胞生长至 80.00% 融合,无血清培养基继续培养 24 h,更换为试验用液。分为空白对照组(0 mol/L ghrelin),不同浓度 ghrelin 组(药物终浓度分别为 10^{-9} 、 10^{-8} 、 10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L),不同时间组(10^{-6} mol/L ghrelin, 0、6、12、18、24 h)。

1.2.2 细胞增殖活力检测(MTT 法) 以 5×10^3 /孔的密度接种于 96 孔板内,37 °C、5.0%CO₂ 饱和湿度培养箱中静置培养 24 h。在细胞约 80.0% 融合状态下,96 孔板中的 HASMCs 换上含 0.2% BSA 的 DMEM 培养基培养 24 h 后,换以含 0.2% BSA 的含药培养基,孵育 48 h 后换上 MTT 液 100 μL,继续孵育 4 h,然后将培养基吸干,每孔加入 200 μL 二甲基亚砜,混匀后于酶标仪 570 nm 处测光密度(OD)值,以检测细胞的数目和活力。

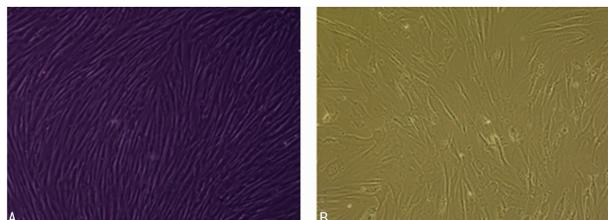
1.2.3 逆转录 PCR(RT-PCR)法检测 Mfn-2 的表达 收集处理完毕后的 6 孔板中的细胞,用 4 °C 预冷 PBS(0.01 mol/L, pH7.2~7.3)洗 3 遍,加入 1 mL TRizol 溶液裂解,按 TRizol 试剂盒使用说明书提取总 RNA,以 DNA/RNA 测定仪测定 RNA 的浓度和纯度。将 2 μL 总 RNA 加入到 20 μL 体系中按逆转录合成试剂盒使用说明书合成 cDNA 待用。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参照。Mfn-2 目的片段为 2 271 bp,引物序列为:5'-ATG TCC CTG CTC TTC TCT CGA TGC-3'(上游)和 5'-TCT GCT GGG CTG CAG GTA CTG GT-3'(下游);GAPDH 引物序列:5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT C-3'(上游)和 5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC-3'(下游)。PCR 条件 94 °C 4 min;94 °C 45 s,60 °C 45 s,72 °C 90 s,共 32 个循环;再 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳并在紫外光下显像。

1.2.4 Western blot 法检测 制作 10% 的分离胶和 5% 积层胶进行蛋白电泳,通过电转移法将蛋白转到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,用含 3% 血清的 TBS-T 封闭 1 h,分别加入 3% 血清的 TBS-T 稀释的 1:3 000 鼠抗人 Mfn-2 单克隆抗体一抗 4 °C 孵育过夜,再同结合辣根过氧化物酶的二抗孵育 1 h,用化学发光试剂盒检测结果,采用 GAPDH 作为内参照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,对试验数据进行 ANOVA 单因素方差分析。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 HASMCs 形态学观察 培养的第 4~6 代人 HASMCs 在显微镜下观察可见呈典型“峰-谷”状生长。细胞形体多呈长梭形,核大,可见明显的肌丝纤维,见图 1。

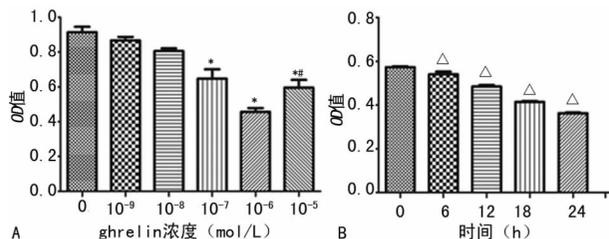


A: 典型“峰-谷”状生长(×40);B: 细胞形体多呈长梭形、核大(×100)。

图 1 HASMCs 形态学观察

2.2 ghrelin 对 HASMC 增殖的影响 与空白对照组相比,

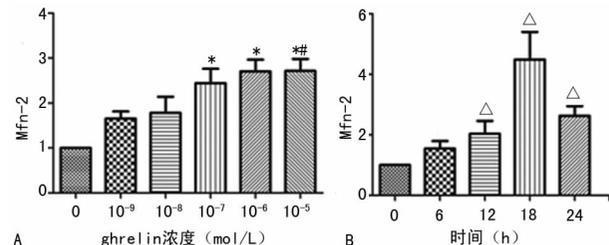
ghrelin 在 $10^{-7} \sim 10^{-5}$ mol/L 浓度范围内均可抑制 HASMC 增殖,其中以 10^{-6} mol/L ghrelin 抑制增殖的作用最为明显, 10^{-6} mol/L ghrelin 组与空白对照组 OD 值比较: $(45.74 \pm 4.78)\% vs. (91.48 \pm 6.85)\%$, 差异有统计学意义($P<0.01$)。与 0 h 组相比,ghrelin 在 6~24 h 均可抑制 HASMC 增殖,24 h 达到高峰 $[36.22 \pm 0.81)\% vs. (57.28 \pm 0.99)\%, P<0.01]$, 见图 2。



A: 不同浓度 ghrelin 对 HASMC 的增殖作用;B: 不同时间 ghrelin (10^{-6} mol/L) 对 HASMC 的增殖作用。*: $P<0.05$, 与 0 mol/L 比较。#: $P<0.05$, 与 10^{-6} mol/L 组比较;△: $P<0.05$, 与 0 h 比较。

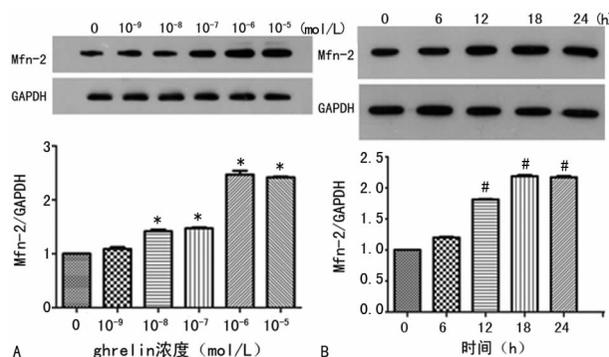
图 2 ghrelin 对 HASMC 增殖的影响

2.3 ghrelin 对 Mfn-2 mRNA 表达的影响 对照组 Mfn-2 mRNA 为 1.0。 $10^{-7} \sim 10^{-5}$ mol/L 的 ghrelin 均能明显上调 Mfn-2 mRNA 的表达(10^{-7} 、 10^{-6} 、 10^{-5} mol/L ghrelin 分别为: 2.44 ± 0.55 、 2.70 ± 0.45 和 2.71 ± 0.46 , $P<0.05$)。 10^{-6} mol/L ghrelin 在 12~24 h 内能明显上调 Mfn-2 mRNA 的表达,18 h 达最高峰(4.48 ± 1.57 , $P<0.01$),但在 6 h,ghrelin 对 Mfn-2 mRNA 的表达无明显影响($P>0.05$),见图 3。



A: 不同浓度 ghrelin 对 Mfn-2 mRNA 的作用;B: 不同时间 ghrelin 对 Mfn-2 mRNA 的作用。*: $P<0.05$, 与 0 mol/L 比较。#: $P<0.05$, 与 10^{-6} mol/L 组比较;△: $P<0.05$, 与 0 h 比较。

图 3 ghrelin 对 Mfn-2 mRNA 表达的影响



A: 不同浓度 ghrelin 对 Mfn-2 蛋白的作用;B: 不同时间 ghrelin 对 Mfn-2 蛋白的作用。*: $P<0.05$, 与 0 mol/L 比较;#: $P<0.05$, 与 0 h 比较。

图 4 ghrelin 对 Mfn-2 蛋白表达的影响

2.4 ghrelin 对 Mfn-2 蛋白表达的影响 对照组 Mfn-2 蛋白

为 1.0。10⁻⁸~10⁻⁵ mol/L 浓度的 ghrelin 均能上调 Mfn-2 蛋白的表达,在 10⁻⁶ mol/L ghrelin 达最高峰(2.46±0.11, P<0.01)。而 10⁻⁹ mol/L 浓度的 ghrelin 对 Mfn-2 蛋白表达无影响(P>0.05)。ghrelin 在 12~24 h 内能明显上调 Mfn-2 蛋白的表达,18 h 达最高峰(2.18±0.03, P<0.01)。而 18 h 和 24 h 之间蛋白表达比较差异无统计学意义(P>0.05),见图 4。

3 讨 论

动脉粥样硬化、高血压、支架内再狭窄等血管增殖性疾病的发病率逐年增加。目前已证实,VSMC 增殖-凋亡失衡是此类疾病的主要特征。抑制 VSMC 增殖,有望成为预防和治疗血管增殖性疾病新的方法。

ghrelin 是 1999 年 Kojima 等^[11]发现的一种可促进生长激素释放的酰化肽。近年研究发现,ghrelin 具有广泛的生理作用,且与心血管疾病、免疫炎症反应、糖尿病、肿瘤等密切相关。研究认为 ghrelin 是一个心脏保护因子,可以抑制血管内皮细胞凋亡,促进血管内皮细胞的增殖^[12],具有血管内皮保护功能,但对血管平滑肌的作用目前仍不清楚。本研究结果显示,ghrelin 能抑制 HASMC 增殖且能促进血管内皮细胞的增殖,推测其对动脉再狭窄有抑制作用。

Mfn-2 是具有抑制 VSMC 增殖功能的基因,参与血管平滑肌细胞分化,有望成为血管增殖性疾病干预的新靶点^[13]。研究发现,在大鼠颈动脉球囊损伤再狭窄模型上,适度上调 Mfn-2 的表达可以明显抑制 VSMC 增殖,抑制率分别为 97.2% 和 82.0%^[14],Mfn-2 在控制细胞增殖中起重要作用。

本课题组发现在 HASMCs,ghrelin 上调 Mfn-2 mRNA 和蛋白的表达和其抑制 HASMC 增殖的作用在浓度和时间上基本上是一致的,也就是说 ghrelin 在上调 Mfn-2 的表达的同时能明显抑制 HASMC 增殖。这提示,ghrelin 可能通过上调 Mfn-2 的表达来抑制 HASMC 增殖。进一步探讨 ghrelin 在心血管疾病发病过程中的作用及机制,可为心血管疾病的防治提供新的靶点。

参考文献

- [1] Li WG, Gavrila D, Liu X, et al. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB activation in human endothelial cells[J]. *Circulation*, 2004, 109(18): 2221-2226.
- [2] Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, et al. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells[J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(1): 57-66.
- [3] Kawaguchi M, Kanemaru A, Fukushima T, et al. Ghrelin administration suppresses inflammation-associated color-

ectal carcinogenesis in mice[J]. *Cancer Sci*, 2015, 106(9): 1130-1136.

- [4] Zhao D, Zhan Y, Zeng H, et al. Ghrelin stimulates interleukin-8 gene expression through protein kinase C-mediated NF-kappaB pathway in human colonic epithelial cells[J]. *J Cell Biochem*, 2006, 97(6): 1317-1327.
- [5] Yuki S, Hideko O, Takahiro S, et al. Regulation of the human ghrelin promoter activity by transcription factors, NF-kappaB and Nkx2[J]. *Int J Endocrinol*, 2015: 580908.
- [6] Kotani K, Sakane N, Saiga K, et al. Serum ghrelin and carotid atherosclerosis in older Japanese people with metabolic syndrome[J]. *Arch Med Res*, 2006, 37(7): 903-906.
- [7] Pöykkö SM, Kellokoski E, Ukkola O, et al. Plasma ghrelin concentrations are positively associated with carotid artery atherosclerosis in males[J]. *J Intern Med*, 2006, 260(1): 43-52.
- [8] Li PF, Guo YH, Li Q, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of rHSG-1 inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats[J]. *Beijing Da Xue Xue Bao*, 2004, 36(3): 259-262.
- [9] Ding Y, Gao H, Zhao L, et al. Mitofusin 2-deficiency suppresses cell proliferation through disturbance of autophagy[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0121328.
- [10] Doran AC, Meller N, Mcnamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(5): 812-819.
- [11] Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach[J]. *Nature*, 1999, 402(6762): 656-660.
- [12] Rossi F, Castelli A, Bianco MJ, et al. Ghrelin inhibits contraction and proliferation of human aortic smooth muscle cells by cAMP/PKA pathway activation[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 203(1): 97-104.
- [13] Jiang GJ, Han M, Zheng B, et al. Hyperplasia suppressor gene associates with smooth muscle alpha-actin and is involved in the redifferentiation of vascular smooth muscle cells[J]. *Heart Vessels*, 2006, 21(5): 315-320.
- [14] Chen KH, Dasgupta A, Ding J, et al. Role of mitofusin 2 (Mfn2) in controlling cellular proliferation[J]. *FASEB J*, 2014, 28(1): 382-394.

(收稿日期:2016-11-26 修回日期:2017-01-14)

《重庆医学》对临床研究论文医学伦理学要求

凡投本刊的涉及人的生物医学研究论文,作者应说明所在用的试验程序是否经过伦理审查委员会(单位性的、地区性的或国家性的)评估,注明批准号。涉及患者(受试者)的应签订知情同意书。

《重庆医学》编辑部