

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.21.003

氯化钴化学模拟低氧与低氧环境对大鼠肺动脉成纤维细胞的作用比较*

柴晓宇,许慧莹,刘钟桢,易亮,刘新民[△]

(北京大学第一医院老年科,北京 100034)

[摘要] **目的** 比较氯化钴(CoCl_2)化学模拟低氧及低氧环境对于原代大鼠肺动脉成纤维细胞(PAFs)增殖、迁移、表型转化的作用。**方法** 分离培养原代大鼠 PAFs,利用 CoCl_2 刺激细胞,或通过低氧细胞培养(1% O_2)刺激诱导 PAFs,通过 CCK-8 试验、细胞划痕、细胞迁移、表型转化标志蛋白及磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(Akt)信号通路蛋白表达的实验结果比较 CoCl_2 与低氧环境对于 PAFs 的作用。**结果** 与对照组相比,100 $\mu\text{mol/mL}$ CoCl_2 刺激对 PAFs 的细胞增殖活力、迁移能力、细胞表型转化能力的作用无明显影响($P>0.05$);而 1% O_2 可以明显提高 PAFs 的细胞增殖活力和迁移活力,并可以使 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)表达上调($P<0.05$)。**结论** CoCl_2 化学模拟低氧与低氧环境对 PAFs 的促增殖、促迁移、促表型转化作用存在差异。

[关键词] 氯化钴;低氧;肺动脉;成纤维细胞;表型转化

[中图分类号] R543.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)21-2889-03

Effects comparison of chemical hypoxia induced by cobalt chloride and hypoxia environment on rat pulmonary arterial fibroblasts*

Chai Xiaoyu, Xu Huiying, Liu Zhonghui, Yi Liang, Liu Xinmin[△]

(Department of Geriatrics, First Hospital, Peking University, Beijing 100034, China)

[Abstract] **Objective** To compare the effects of cobalt chloride (CoCl_2) induced chemical hypoxia and hypoxia environment on the proliferation, migration and phenotype transformation of rat primary pulmonary artery fibroblasts (PAFs). **Methods** Primary PAFs were isolated and cultured. Cells were stimulated by CoCl_2 , or hypoxia cell culture (1% O_2) was used to stimulate and induce PAFs. Then the effects of CoCl_2 and hypoxia environment on PAFs were compared by CCK-8 assay, scratch assay, transwell assay, phenotype marker protein expression and PI3K/Akt signaling pathway protein expression. **Results** Compared with the control group, 100 $\mu\text{mol/mL}$ CoCl_2 stimulation had no significant effect on the cell proliferation activity, cell migration ability and phenotype transformation ability of PAFs ($P>0.05$); while 1% O_2 could significantly improve the cell proliferation and migration activities of PAFs as well as the upregulation of α -SMA expression ($P<0.05$). **Conclusion** There exist differences of effects between CoCl_2 induced chemical hypoxia and hypoxia environment on promoting cell proliferation, cell migration and phenotype transformation in PAFs.

[Key words] cobalt chloride; hypoxia; pulmonary artery; fibroblasts; phenotype transformation

低氧是多种疾病共同的病理生理基础,也是许多科学研究所依赖的实验条件^[1-3]。氯化钴(CoCl_2)是体外研究中较常使用的化学低氧诱导剂^[4],它可以通过增加缺氧诱导因子 1 α (hypoxia induced factor 1 α , HIF-1 α)的表达水平而影响下游的低氧反应元件,从而使细胞达到化学低氧的状态^[5-7]。肺动脉成纤维细胞(pulmonary arterial fibroblasts, PAFs)在低浓度氧环境中,其增殖活性、运动能力和细胞表型都有显著的改变,而 PAFs 的这一特性也成为低氧性肺血管重塑的重要病理生理基础^[8-9]。 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)是成纤维细胞向肌成纤维细胞转化的表型蛋白之一,正常 PAFs 仅少量表达 α -SMA 蛋白,常作为 PAFs 细胞表型转化的标志蛋白。本研究拟通过 CoCl_2 和气体低氧刺激 PAFs,并通过观察 PAFs 细胞增殖活力、细胞形态,以及向肌成纤维细胞转化的标志蛋白 α -SMA 表达的变化,比较 CoCl_2 诱导的化学缺氧和气体低氧对特定研究对象作用的异同。

1 材料与与方法

1.1 实验动物与试剂 SD 雄性大鼠,体质量(100 \pm 20)g,来源于

本院动物实验中心(动物实验经本院动物伦理委员会批准,批准号:J201533);CCK-8 细胞增殖活性检测试剂盒购自日本同仁化学公司;水合氯化钴($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)购自美国 Ameresco 公司;抗体 α -SMA 购自美国 Abcam 公司,胎牛血清购自美国 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 PAFs 培养 原代 PAF 细胞取自雄性 SD 大鼠(100 \pm 20)g。立体显微镜下分离肺动脉外膜,组织块培养法培养 PAFs 原代细胞并行细胞鉴定。细胞培养基采用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基,加入商品化细胞用青霉素-链霉素抗菌药物。于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 细胞培养箱孵育。第 3~6 代 PAFs 用于细胞实验研究。将实验用 PAFs 分为对照组、 CoCl_2 化学低氧刺激组及 1% O_2 低氧刺激组进行相应实验研究。

1.2.2 细胞增殖活力测定 PAFs 接种于 96 孔板,24 h 后继续无血清同步化培养 12 h,之后分别设置复孔并加入梯度 CoCl_2 (50、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$)或置入 1% O_2 低氧细胞培养箱培养 24 h。然后按照 CCK-8 试剂盒说明书,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液后继续在常规细胞培养箱孵育 2 h 左右,在酶

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81270114)。 作者简介:柴晓宇(1989-),在读博士,主要从事低氧性肺动脉高压的研究。

[△] 通信作者, E-mail: lxm2128@163.com。

标仪 450 nm 处测定各孔吸光度(A)值。

1.2.3 细胞划痕实验 将 PAFs 以 1×10^5 /mL 的密度接种于 6 孔板, 细胞生长融合达 90% 时, 用 200 μ L 枪头在培养板内沿直线划痕并用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗数次, 为保证细胞渗透压, 用含极低浓度(0.5%)胎牛血清的培养基继续培养。分别以 100 μ mol/L CoCl_2 和 1% O_2 刺激 PAFs 12 h 后观察划痕愈合情况并采集图像分析细胞迁移距离。

1.2.4 Transwell 迁移实验 采用 8 μ m 孔径的 Transwell 小室, 将含有 1% 胎牛血清的细胞悬液以 1×10^6 /L 的密度将细胞接种于 Transwell 小室上室; 加入 100 μ mol 的 CoCl_2 或者置于 1% O_2 细胞培养箱中。Transwell 小室下室加入含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基孵育 24 h, 棉签擦去内室的细胞, 上室基底膜外面的细胞经固定并用结晶紫染色, 在显微镜下进行细胞计数。

1.2.5 蛋白质印迹法(Western Blotting) 实验组细胞相应处理 6 h 后用预冷 PBS 清洗, 冰上加入 RIPA 与 PMSF 混合细胞裂解 10 min, 收集细胞裂解液, 高速离心 5 min 后 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性。20 μ g 总蛋白上样, 经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离, 转至硝酸纤维素膜(NC); Tris 缓冲生理盐水(TBS)加吐温 20(TBST)清洗 3 次, 每次 10 min, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h; 加入相应一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 复温后 TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗, 室温孵育 1 h; TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 以 ECL 显色。

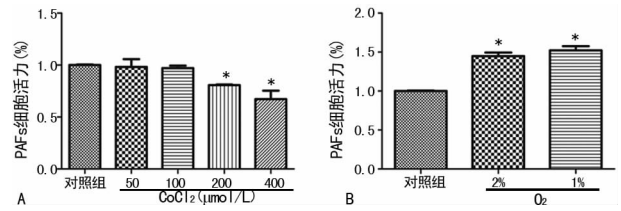
1.2.6 细胞免疫荧光 通过细胞免疫荧光方法对 PAFs 的 α -SMA 进行检测。将爬片细胞进行固定, 并 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育 α -SMA(1:200)和 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)(1:400), 室温下 PBS 润洗 15 min, 继而采用荧光素酶标记的二抗 Alexa Fluor 488 IgG 和 Alexa Fluor 594 IgG 室温下孵育 1 h 后 PBS 润洗除去多余抗体。4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)(1:5000)室温避光染色细胞核 10 min。荧光显微镜下观察实验结果并采集图像。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计软件进行数据分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用独立样本 t 检验, 取双侧检测水准 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PAFs 增殖活性 50、100 μ mol/L CoCl_2 作用于 PAFs 24 h 后, 其细胞活力分别为 $(98.24 \pm 1.92)\%$ 、 $(97.11 \pm 4.02)\%$, 与对照组相比 PAFs 活力没有明显改变($P=0.83$ 、

0.29); 200、400 μ mol/L CoCl_2 作用于 PAFs 24 h 后, 各组细胞活力分别为 $(80.71 \pm 0.96)\%$ 、 $(67.13 \pm 1.46)\%$, 与对照组相比细胞活性明显降低($P=0.006$ 、 0.039), 见图 1A。2% O_2 及 1% O_2 氧浓度培养 24 h 后的 PAFs 细胞活力分别为 $(140.47 \pm 8.23)\%$ 、 $(152.30 \pm 9.42)\%$, 与对照组相比明显增加($P=0.0007$ 、 0.0006), 见图 1B。



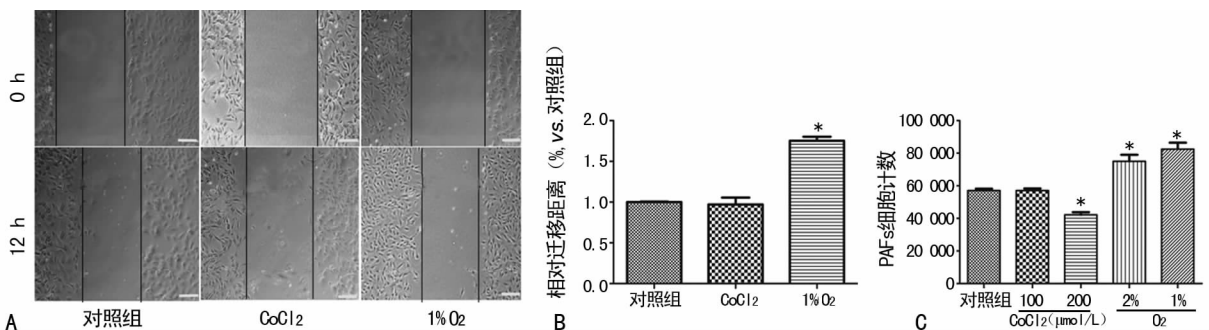
A: CoCl_2 对 PAFs 增殖活性的影响; B: 低氧对 PAF 增殖活性的影响; * : $P<0.05$, 与对照组比较

图 1 CoCl_2 及低氧对 PAFs 细胞增殖活性的影响

2.2 PAFs 迁移能力 100 μ mol/L CoCl_2 刺激 PAFs 12 h 后划痕迁移距离与对照组相比, 差异无统计学意义($P=0.24$); 1% O_2 培养 12 h 后 PAFs 的划痕迁移距离较对照组明显增加($P<0.05$), 见图 2A、B。100 μ mol/L CoCl_2 对小孔迁移的细胞数量没有明显影响($P=1.00$), 而 200 μ mol/L CoCl_2 可以明显抑制 PAFs 的穿孔迁移数量($P=0.0016$)。2% O_2 与 1% O_2 培养 12 h 后 PAFs 的 Transwell 迁移细胞数量较对照组明显增加($P=0.012$ 、 0.0035), 见图 2C。

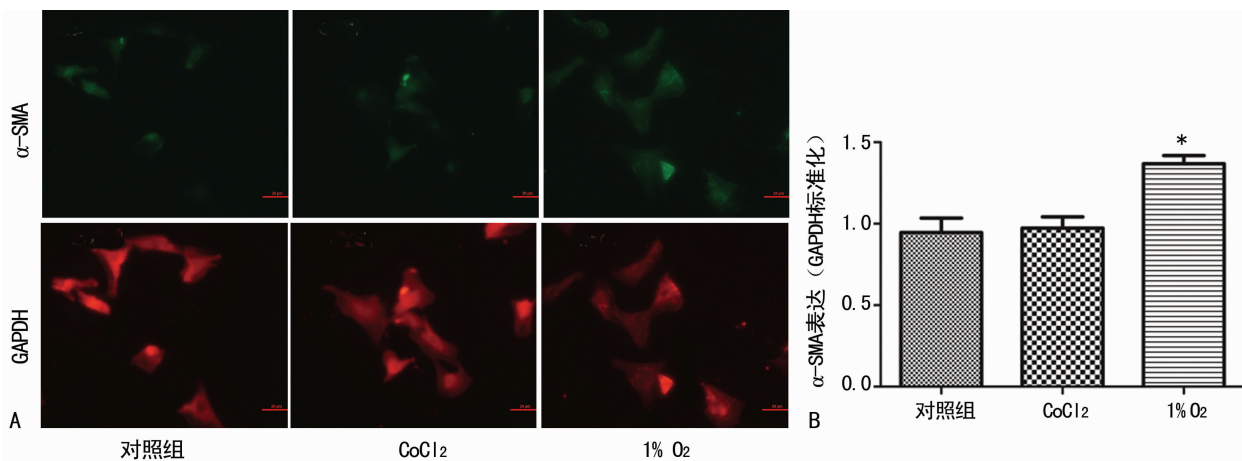
2.3 PAFs 表型转化蛋白表达 细胞免疫荧光绿色显色为 α -SMA 蛋白荧光结果, 红色显色为 GAPDH 蛋白荧光结果(图 3A)。不同刺激条件处理 PAFs 24 h 后, 100 μ mol/L CoCl_2 对于 PAFs α -SMA 表达没有明显影响($P=0.813$), 而 1% O_2 可以明显提高 PAFs α -SMA 的荧光强度($P=0.0091$), 见图 3B。

2.4 PAF 信号通路蛋白表达 Western blotting 结果提示, 经 CoCl_2 处理 6 h 后可以增加 PAFs 的 HIF-1 α 表达水平, 并且提高磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(Akt)信号通路中 P110 α 、p-Akt 的蛋白表达水平, 经过灰度分析相比于对照组, 其表达水平分别是对照组的 (2.49 ± 0.36) 、 (1.04 ± 0.28) 、 (3.16 ± 0.48) 倍, 差异有统计学意义($P=0.0028$, $P=0.0052$, $P<0.0001$); 而经 1% O_2 低氧处理 6 h 后 PAFs 也可以明显增加 P110 α 、p-Akt 的蛋白表达水平, 经过灰度分析相较于对照组, 其表达水平分别是对照组的 (2.62 ± 0.28) 、 (2.38 ± 0.19) 倍, 同样差异有统计学意义(均 $P<0.0001$), 见图 4。



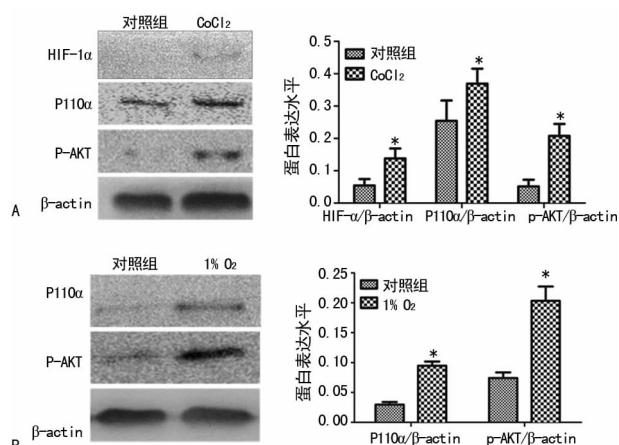
A: PAF 划痕实验结果; B: PAF 划痕迁移距离分析结果; C: Transwell 细胞计数结果; * : $P<0.05$, 与对照组比较; * * : $P<0.01$, 与对照组比较

图 2 CoCl_2 及低氧对 PAFs 迁移能力的影响



A: α-SMA 及 GAPDH 免疫荧光结果; B: α-SMA 免疫荧光强度分析; * : P<0.05, 与对照组比较

图 3 CoCl₂ 及低氧对 PAFs α-SMA 免疫荧光表达影响



A: CoCl₂ 刺激后 PAFs HIF-1α, P110α, p-Akt 的表达; B: 1% O₂ 刺激后 PAFs P110α, p-Akt 的表达; * : P<0.05, 与对照组比较

图 4 CoCl₂ 及低氧作用下 PAFs 信号通路蛋白的表达及分析

3 讨 论

低氧可以诱导和加重多种疾病,特别是呼吸系统疾病,在疾病的病理生理过程中扮演着非常重要的角色^[10]。越来越多的研究表明,PAFs 对于低氧性肺动脉高压的发生、发展起着关键的作用^[8-9]。在低氧条件下,PAFs 的增殖反应在血管各层中出现最早,并可以迁移至血管中层或内层,其向肌成纤维细胞转化也有显著增加,PAFs 应对外环境低氧的一系列反应均是参与低氧性肺动脉高压血管重塑的重要病理生理过程^[9,11]。

CoCl₂ 作为体外研究中常使用的低氧诱导剂,可以通过二价钴离子的作用减少 HIF-1α 的降解而影响下游的缺氧反应元件,从而影响能量代谢、红细胞生成、细胞增殖与分化^[12]。CoCl₂ 作用于不同的研究对象所发挥的作用也有很大差异。有研究报道,CoCl₂ 可以增加肺动脉中膜平滑肌细胞的增殖,而中膜变化被认为是肺动脉高压病理过程中最重要的改变^[13]。有关 CoCl₂ 应用于 PAFs 的研究还十分有限,在笔者的研究中,CoCl₂ 所诱导的低氧并没有使 PAFs 在低氧环境所展现的特性得以体现,而 CoCl₂ 在本研究中对 PAFs 展现出其潜在的毒性作用,可见 CoCl₂ 化学模拟低氧与低氧环境在特定的研究设计中不能完全模拟替代。

PI3K/mTOR 信号通路参与细胞的增殖、蛋白合成、细胞周期等多项生命活动,并可能参与 PAFs 在低氧环境中的变化调控^[14-15],而 HIF-1α 通路也参与低氧诱导的 PAFs 增殖改变^[16]。本研究中 CoCl₂ 刺激下的 PAFs 其 HIF-1α 表达增加,而相应的低氧刺激后的 PAFs HIF-1α 蛋白在常规实验操作后并未检测出,这可能与 HIF-1α 蛋白在常氧条件下自身降解迅速有关,而 CoCl₂ 可以相对稳定地减少 HIF-1α 的降解增加蛋白的表达。CoCl₂ 作为 HIF-1α 的诱导剂,将在低氧性疾病的机制研究中发挥应有的作用,更多深入的研究还有待继续。

综上所述,CoCl₂ 诱导的低氧与低氧环境对于原代大鼠 PAFs 的增殖、迁移及表型转化的作用不同,但均可以引起 PAFs 的 PI3K/Akt 信号通路上调,其具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Wang W, Liu J, Ma A, et al. mTORC1 is involved in hypoxia-induced pulmonary hypertension through the activation of notch3[J]. J Cell Physiol, 2014, 229(12): 2117-2125.
- [2] Shimoda LA, Laurie SS. HIF and pulmonary vascular responses to hypoxia[J]. J Appl Physiol (1985), 2014, 116(7): 867-874.
- [3] Friedman JK, Nitta CH, Henderson KM, et al. Intermittent hypoxia-induced increases in reactive Oxygen species activate NFATc3 increasing endothelin-1 vasoconstrictor reactivity[J]. Vascul Pharmacol, 2014, 60(1): 17-24.
- [4] Bresson C, Darolles C, Carmona A, et al. Cobalt chloride speciation, mechanisms of cytotoxicity on human pulmonary cells, and synergistic toxicity with Zinc[J]. Metallomics, 2013, 5(2): 133-143.
- [5] Johns RA, Takimoto E, Meuchel LW, et al. Hypoxia-Inducible factor 1 alpha is a critical downstream mediator for Hypoxia-Induced mitogenic factor (FIZZ1/RELM alpha)-Induced pulmonary hypertension [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016, 36(1): 134-144.
- [6] Veith C, Schermuly RT, Brandes RP. Molecular mechanisms of hypoxia-inducible factor-induced pulmonary arterial smooth muscle cell alterations in (下转第 2894 页)

而发生 G₀/G₁ 期阻滞,这正是一种显性负效应^[10]。TEA 抑制 P13K/Akt 信号通路活性,干扰喉癌细胞的正常周期,阻断 DNA 合成,直接抑制喉癌细胞增殖和生长,诱导喉癌细胞凋亡^[11-12]。为恶性肿瘤的治疗探寻了新的途径与思路。

综上所述,P13K/Akt 信号通路与喉癌细胞的生长和转移潜能有直接关系^[13]。通道阻滞剂 TEA 下调 P13K/Akt 信号通路,对人喉癌 Hep-2 细胞增殖有重要抑制作用,可进一步促进 Hep-2 细胞凋亡,这一观察结果具有分子生物学的理论意义^[14]。当然,要全面应用到临床还需要进一步探索。

参考文献

- [1] 杨智英,谭超超,杨治平,等. 维甲酸对肝癌细胞 HtPG2 糖基化磷脂酰肌醇特异性磷脂酶 D 表达及细胞生物学特性的影响[J]. 生命科学研究,2012,16(1):42-47.
- [2] 宋岩,刘秀萍,白伟良,等. LY294002 联合顺铂阻断 PI3K-Akt 通路诱导喉癌 Hep-2 细胞凋亡研究[J]. 实用肿瘤杂志,2013,28(2):132-134.
- [3] 李豫江,张伟,赵磊. 来氟米特通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导大鼠系膜细胞凋亡的作用[J]. 重庆医学,2016,45(8):1022-1025.
- [4] 魏蕾,江黎珠,于超,等. 下调 FoxM1 表达对人喉癌 Hep-2 细胞顺铂敏感性的影响[J]. 第三军医大学学报,2015,37(16):1603-1608.
- [5] Georgakis GV, Younes A. From Rapa Nui to rapamycin: targeting PI3K/Akt/mTOR for cancer therapy[J]. Expert Rev Anticancer Ther,2006,6(1):131-140.
- [6] 江红轲. 游泳训练通过激活 P13K-Akt 信号通路抑制 2 型糖尿病引起的心肌细胞凋亡[J]. 湖南师范大学自然科学

学报,2012,35(3):71-77.

- [7] 权悦,马莹,周峰,等. 多糖偶联细胞毒性药物治疗恶性肿瘤的研究进展[J]. 癌变·畸变·突变,2016,28(1):77-80.
- [8] 谭超超,唐建华,卢永娟,等. 糖基化磷脂酰肌醇磷脂酶 D 与动脉粥样硬化关系的研究[J]. 中华老年医学杂志,2012,31(11):954-958.
- [9] 祝冰晶,王宇亮,罗虎,等. CA916798 基因通过 PI3K/AKT 通路参与肺癌顺铂耐药[J]. 第三军医大学学报,2013,35(7):618-621.
- [10] 张萌,彭利,乔治斌,等. PI3K/Akt 信号通路抑制剂对人肝癌 HepG2 细胞的体外抑制作用及其机制[J]. 世界华人消化杂志,2013,21(23):2250-2257.
- [11] 余文发,赵玉林,王萍,等. siRNA 沉默 C-erbB-2 基因对人喉癌 Hep-2 细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志,2014,28(12):894-897.
- [12] Levine DA, Bogomolny F, Yee CJ, et al. Frequent mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancers [J]. Clin Cancer Res,2005,11(8):2875-2878.
- [13] 杨智英,谭超超,杨治平,等. GPI-PLD 通过下调 PI3K-Akt 信号通路活性抑制肝癌细胞的生长[J]. 中南大学学报(医学版),2014,39(9):873-878.
- [14] Wang M, Vogel I, Kalthoff H. Correlation between metastatic potential and variants from colorectal tumor cell line HT-29[J]. World J Gastroenterol,2003,9(11):2627-2631.

(收稿日期:2017-02-07 修回日期:2017-04-12)

(上接第 2891 页)

- pulmonary hypertension[J]. J Physiol, 2016, 594(5): 1167-1177.
- [7] Masoud GN, Li W. HIF-1 pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy[J]. Acta Pharm Sin B, 2015, 5(5): 378-389.
- [8] Brito J, Siques P, Arribas SM, et al. Adventitial alterations are the main features in pulmonary artery remodeling due to Long-Term chronic intermittent hypobaric hypoxia in rats[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 169841.
- [9] Stenmark KR, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya EA, et al. The adventitia: essential role in pulmonary vascular remodeling[J]. Compr Physiol, 2011, 1(1): 141-161.
- [10] Veit F, Pak O, Brandes RP, et al. Hypoxia-dependent reactive oxygen species signaling in the pulmonary circulation; focus on ion channels[J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 22(6): 537-552.
- [11] Forte A, Della Corte A, De Feo MA, et al. Role of myofibroblasts in vascular remodelling: focus on restenosis and aneurysm[J]. Cardiovasc Res, 2010, 88(3): 395-405.
- [12] Xiao HJ, Gu ZY, Wang GX, et al. The possible mechanisms underlying the impairment of HIF-1 alpha pathway signaling in hyperglycemia and the beneficial effects of

certain therapies[J]. Int J Med Sci, 2013, 10(10): 1412-1421.

- [13] Wei C, Li HZ, Wang YH, et al. Exogenous spermine inhibits the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells caused by chemically-induced hypoxia via the suppression of the ERK1/2-and PI3K/AKT-associated pathways[J]. Int J Mol Med, 2016, 37(1): 39-46.
- [14] Zhang J, Narayan VM, Juedes N, et al. Hypoxic upregulation of preproendothelin-1 gene expression is associated with protein tyrosine kinase-PI3K signaling in cultured lung vascular endothelial cells[J]. Int J Clin Exp Med, 2009, 2(1): 87-94.
- [15] Gerasimovskaya EV, Tucker DA, Stenmark KR. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and mammalian target of rapamycin is necessary for hypoxia-induced pulmonary artery adventitial fibroblast proliferation[J]. J Appl Physiol, 2005, 98(2): 722-731.
- [16] Krick S, Hanze J, Eul B, et al. Hypoxia-driven proliferation of human pulmonary artery fibroblasts: cross-talk between HIF-1alpha and an autocrine angiotensin system [J]. FASEB J, 2005, 19(7): 857-859.

(收稿日期:2017-02-11 修回日期:2017-04-16)