

回转模拟失重对共培养体系中平滑肌细胞增殖及凋亡的影响*

高原, 潘益凯, 李程飞, 孟欣, 石菲, 赵疆东, 杨长斌, 孙喜庆, 王永春**

(空军军医大学 航空航天医学系 航空航天医学训练教研室, 陕西 西安 710032)

[摘要] 目的: 探讨回转模拟失重对与人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 共培养的人主动脉平滑肌细胞 (HASMCs) 增殖及凋亡的影响。方法: 建立 HUVECs 与 HASMCs 共培养模型, 以细胞回转器模拟失重效应, 分为正常重力组和模拟失重组; 共培养 48 h 时, 观察 HASMCs 形态, 采用 Western blot 检测 2 组 HASMCs 细胞增殖细胞核抗原 (PCNA)、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 及 Bcl-2 相关 X (Bax) 蛋白表达, 分析模拟失重对共培养的 HASMCs 细胞增殖及凋亡的影响。结果: 共培养 48 h 时, 与正常重力组比较, 模拟失重组 HASMCs 形态由长梭形变为多角形或不规则形; PCNA 及 Bax 蛋白表达显著下降 ($P < 0.05$)、Bcl-2 蛋白表达显著增高 ($P < 0.05$)。结论: 模拟失重 48 h 可抑制与 HUVECs 共培养的 HASMCs 增殖和凋亡。

[关键词] 失重模拟; 平滑肌细胞; 共培养; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R852.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)03-0274-05

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.03.006

Effect of Simulated Microgravity on Proliferation and Apoptosis of Smooth Muscle Cells in Co-culture System

GAO Yuan, PAN Yikai, LI Chengfei, MENG Xin, SHI Fei, ZHAO Jiangdong,

YANG Changbin, SUN Xiqing, WANG Yongchun

(Department of Aerospace Medical Training, School of Aerospace Medicine,

Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of simulated microgravity on proliferation and apoptosis of human aortic smooth muscle cells (HASMCs) co-cultured with human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods:** The co-culture model of HUVECs and HASMCs was established. The clinostat was employed to simulate microgravity. Cells were divided into normal gravity group and simulated weightless group based on their co-culture conditions. The morphology of HASMCs was observed at 48 h after co-culture, and Western blot was used to detect the expression levels of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), B lymphocyte tumor-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax). The effects of simulated microgravity on cell proliferation and apoptosis of co-cultured HASMCs were observed. **Results:** Compared with the normal gravity group, the morphology of HASMCs changed from long fusiform to polygonal or irregular in simulated weightless group. The expression levels of PCNA and Bax were significantly decreased ($P < 0.05$), whereas Bcl-2 protein expression was remarkably increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Simulated microgravity can inhibit the proliferation and apoptosis of HASMCs co-cultured with HUVECs.

[Key words] weightlessness simulation; smooth muscle cells; co-culture; proliferation; apoptosis

*[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81741121, 81471817)

**通信作者 E-mail: wangych@fmmu.edu.cn

网络出版时间: 2019-03-23 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190323.1455.006.html>

长期失重环境可致航天员出现心血管功能异常,主要表现为返回后的立位耐力和运动耐力下降^[1-2],影响航天员的健康。虽经大量研究,但其发生机制仍不清楚。近期研究认为,航天员立位耐力不良可能与失重后血管功能及结构的改变有关^[3-6]。血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs)与血管平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMCs)作为血管壁的主要结构细胞,在调节血管舒缩功能、维持血压和血管重塑中均发挥重要作用。现已证实,失重/模拟失重环境可致 VECs 与 SMCs 的形态、功能、结构及基因表达等发生改变^[7-8],本课题组前期对此也做了大量的工作^[9-14]。然而,既往的诸多研究仅专注于模拟失重对单独培养 VECs 或单独培养 SMCs 的影响,而在模拟失重环境下两种细胞的相互调节作用研究则未见相关报道。本研究以体外共培养的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)和人主动脉平滑肌细胞(human aortic smooth muscle cells, HASMCs)为研究对象,通过回转器模拟失重效应,观察回转模拟失重 48 h 时与 HUVECs 共培养的 HASMCs 形态,检测 HASMCs 细胞增殖细胞核抗原(Proliferating Cell Nuclear Antigen, PCNA)、B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)及 Bcl-2 相关 X(Bax)蛋白表达,探讨回转模拟失重对与 HUVECs 共培养的 HASMCs 增殖及凋亡的影响,从一个新的角度揭示失重/模拟失重血管功能和结构异常的分子机制,为进一步探索失重后心血管功能失调的防护提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

HUVECs 为本实验室留存、HASMCs 购自 Sciencell 公司,高糖 DMEM 细胞培养液购自 Hyclone 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物材料有限公司,胰蛋白酶购自美国 Millipore 公司,0.4 μm 孔径 transwell 6 孔聚酯透明膜购自美国 Corning 公司,Trizol 裂解液购自 Invitrogen life technologies,细胞增殖细胞核抗原(PCNA)和 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)一抗购自 Abcam 公司,ECL 发光检测试剂盒购自德国 Merck Millipore 公司。

1.2 方法

1.2.1 体外共培养体系的建立 细胞处理:将复

苏的 HUVECs 和 HASMCs 分别接种于 25 cm² 培养瓶中,在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中过夜培养后,更换 10% DMEM 高糖培养液继续培养,待细胞 70% 融合后,以 0.05% 胰蛋白酶消化细胞,离心后重悬。共培养体系建立:如图 1 所示,先将 HUVECs 按照 1 × 10⁵ 的密度接种于 transwell 小室下表面,加入 10% DMEM 高糖培养液培养 24 h,待细胞完全贴壁后,翻转 transwell 小室并置于 6 孔板中,加培养液覆盖 HUVECs 细胞,而后在 transwell 小室上表面按照 3 × 10⁵ 的密度接种 HASMCs,静置培养 24 h 至细胞完全贴壁,建立 HUVECs 和 HASMCs 的 1:3 共培养体系。

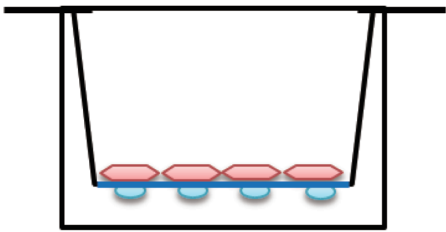


图 1 HUVECs 和 HASMCs 共培养模型的建立
Fig. 1 Establishment of the co-culture system of HUVECs and HASMCs

1.2.2 共培养体系的模拟失重效应 模拟失重组细胞处理:在细胞行模拟失重效应前,将灌满 10% DMEM 高糖培养液的回转舱置于 37℃ 培养箱中预热,而后在超净台中将 transwell 小室插入到回转舱中并保持半透膜的方向与回转舱纵轴平行,完全排除回转舱内残留的气泡以消除剪切应力的影响,拧紧回转舱顶盖,将回转舱固定于回转器上,设定转速为 24 r/min 以模拟失重效应,48 h 后取下回转舱留取细胞样本。地面正常重力对照组除不行回转外,其他操作与模拟失重组相同。

1.2.3 细胞增殖及凋亡测定 待细胞模拟失重 48 h 后,收集两组细胞并裂解,提取细胞总蛋白并定量,按照每个泳道 20 μg 的量进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、5% 脱脂奶粉封闭、一抗(PCNA 为 1 000:1、Bax 为 1 000:1、Bcl-2 为 1:1 000)4℃ 孵育过夜,洗膜后二抗孵育 2 h,ECL 化学发光后凝胶成像仪成像观察拍照。

1.3 检测指标

于共培养 48 h 时,比较两组 HASMCs 形态,两组 HASMCs 中 PCNA、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达变化情况。

1.4 统计学处理

所有实验均在相同条件下重复 3 次。结果采用图像分析软件 Image J 进行灰度分析,利用 SPSS 19.0 统计软件处理,实验数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模拟失重 48 h 对共培养的 HASMCs 形态的影响

利用倒置显微镜观察 HASMCs 形态的改变,结果发现在 transwell 半透膜上单独培养的 HASMCs 为长梭形肥大细胞,而与 HUVECs 共培养后的 HASMCs 形态仍为长梭形,但形态较单独培养的相比呈现更细长的改变,而与正常重力组比较,模拟失重 48 h 后共培养的 HASMCs 形态变为多角形或不规则形。

2.2 模拟失重 48 h 对共培养的 HASMCs 增殖的影响

以 Western blot 检测 PCNA 蛋白表达情况观察模拟失重对 HASMCs 增殖的影响,结果发现,与 HUVECs 共培养的 HASMCs 在模拟失重 48 h 后与正常重力组相比,PCNA 的表达量显著降低($P < 0.05$),提示模拟失重 48 h 可抑制与 HUVECs 共培养的 HASMCs 的增殖能力,见图 2。

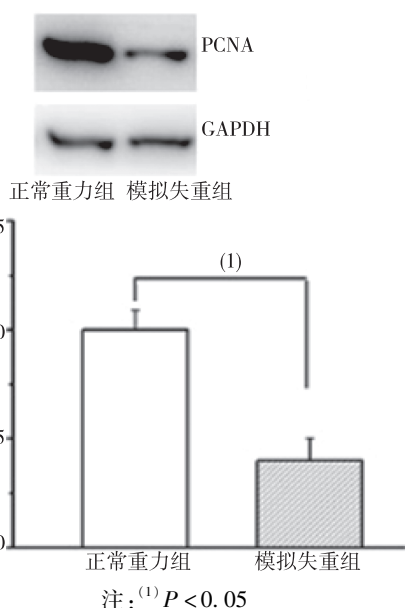


图 2 模拟失重 48 h 对共培养的 HASMCs 增殖的影响
Fig. 2 The effect of simulated microgravity on PCNA expression of HASMCs

2.3 模拟失重 48 h 对共培养的 HASMCs 凋亡的影响

以 Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达变化观察模拟失重对 HASMCs 凋亡的影响,结果发现,与正常重力组相比,模拟失重 48 h 后与 HUVECs 共培养的 HASMCs 中 Bax 的表达量显著降低($P < 0.05$),Bcl-2 的表达量则显著增高($P < 0.05$),提示模拟失重 48 h 可抑制与 HUVECs 共培养的 HASMCs 的凋亡。见图 3。

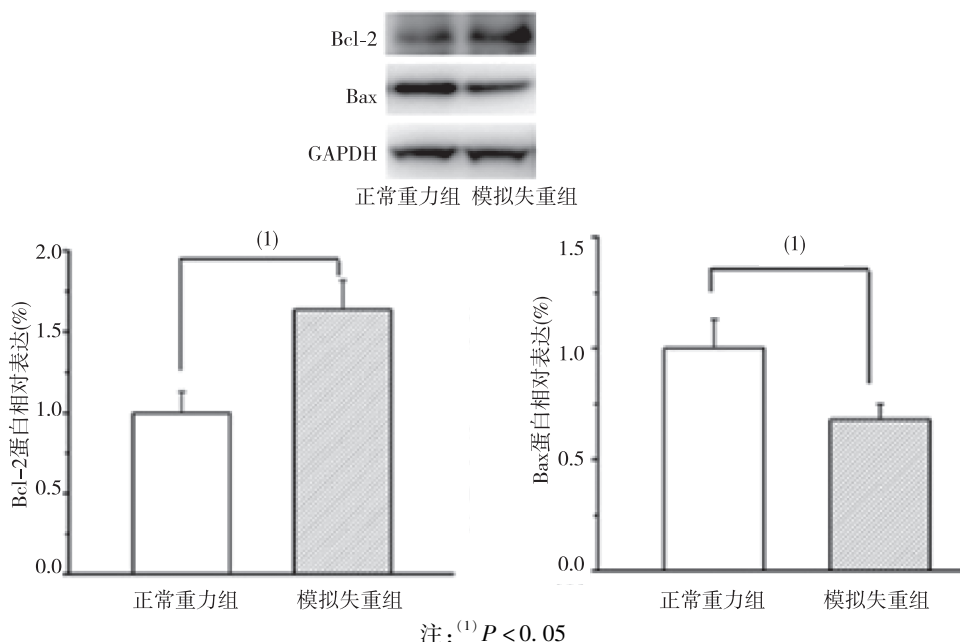


图 3 模拟失重 48 h 对共培养的 HASMCs 凋亡的影响

Fig. 3 The effect of simulated microgravity on Bcl-2 and Bax expressions of HASMCs

3 讨论

VECs 和 SMCs 在结构上毗邻,在功能上相互影响。VECs 既可以通过旁分泌血管活性物质,也可以通过细胞间的直接通讯作用于 SMCs,从而调控血管平滑肌的功能。本研究利用建立的 HUVECs 和 HASMCs 的共培养体系,观察了模拟失重对共培养的 HASMCs 形态、增殖及凋亡的变化。结果发现,与地面正常重力组相比,模拟失重 48 h 可引起共培养的 HASMCs 形态改变,PCNA、Bax 蛋白表达下降、Bcl-2 蛋白表达增高,提示模拟失重 48 h 可抑制与 HUVECs 共培养的 HASMCs 增殖和凋亡。

近期研究认为,失重后机体心血管功能失调的发生原因与血管功能改变有关。SMCs 位于血管中膜,是构成血管壁的主要构成细胞,可通过收缩和舒张来调节血管张力,故其功能状态在维持血管生理功能中发挥重要作用。动物实验表明,模拟失重可引起 SMCs 功能及结构出现区域性分化改变^[15-17],主要表现在模拟失重可致大鼠前半身血管呈现增生性改变,反应性增强,而后半身血管则出现萎缩性改变,反应性减弱。大鼠模拟失重后前半身血管 SMCs 层数增多,凋亡减少以及增殖能力提高,后半身血管 SMCs 则出现相反改变。然而,既往的诸多研究仅专注于模拟失重对 VECs 或 SMCs 的影响,而对模拟失重下两者的相互调节作用研究则未见相关报道。事实上,SMCs 的形态、功能及表型在单独培养和与 VECs 共培养时对相同刺激的反应是不一致的^[18-20]。如在共培养体系中,VECs 的存在可提高 SMCs 的迁移能力,并认为其机制与 VECs 持续释放 PDGF、IL-6 等血管活性物质有关^[21-22]。而 VECs 的功能状态也会对 SMCs 产生不同的影响,如对数生长的 VECs 可促进 SMCs 向合成表型转化,而融合期的 VECs 则维持 SMCs 的收缩表型^[23-24]。然而,对于模拟失重环境下,VECs 对共培养的 SMCs 相关影响则鲜见报道。Zhang 等^[25]利用 VECs 在回转模拟失重 24 h 后收集的条件培养基,加入到 SMCs 中进行培养而后行模拟失重效应,发现地面正常重力下 VECs 条件培养基可显著降低 SMCs 的迁移能力,而模拟失重可消除上述对迁移的抑制作用。本实验采用纤维膜为媒介建立了 HUVECs 和 HASMCs 的共培养模型,相比于两种细胞的混合培养或者利用鼠尾胶原制备的悬浮胶共培养体系,这种共培养模型可以使得两种细胞易于分离进行后续研究,而

且这种共培养体系中的 HUVECs 和 HASMCs 可以通过纤维膜上的小孔实现直接及间接通讯,能够更好的模拟体内两种细胞的交互作用。

综上所述,研究模拟失重下共培养的 VECs 对 SMCs 功能和结构的影响,对于理解失重后血管功能及结构异常具有重要意义。本研究利用建立的 HUVECs 和 HASMCs 共培养模型,发现与正常重力对照细胞相比,模拟失重可引起共培养模型中 HASMCs 形态发生改变、增殖及凋亡受抑,然而其分子机制仍不清楚,尚待深入研究。

4 参考文献

- [1] TANAKA K, NISHIMURA N, KAWAI Y. Adaptation to microgravity, deconditioning, and countermeasures[J]. *J Physiol Sci*, 2017,67(2):271-281.
- [2] LEE S M, FEIVESON A H, STEIN S, et al. Orthostatic intolerance after iss and space shuttle missions[J]. *Aerosp Med Hum Perform*, 2015,86: 54-67.
- [3] PASTUSHKOVA L H, RUSANOV V B, GONCHAROVA A G, et al. Urine proteome changes associated with autonomic regulation of heart rate in cosmonauts[J]. *BMC Syst Biol*, 2019,13(Suppl 1):17.
- [4] BIMPONG-BUTA N Y, JIRAK P, WERNLY B, et al. Analysis of human microcirculation in weightlessness: Study protocol and pre-study experiments[J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2018,70(1):119-127.
- [5] FEDOTOV A A, AKULOV S A, AKULOVA A S, et al. Alterations in cardiovascular system under artificially simulated microgravity: preliminary study[J]. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2016,2016: 204-206.
- [6] ZHU H, WANG H, LIU Z. Effects of real and simulated weightlessness on the cardiac and peripheral vascular functions of humans: A review[J]. *Int J Occup Med Environ Health*, 2015,28(5):793-802.
- [7] PIETSCH J, GASS S, NEBULONI S, et al. Three-dimensional growth of human endothelial cells in an automated cell culture experiment container during the SpaceX CRS-8 ISS space mission - The SPHEROIDS project[J]. *Biomaterials*, 2017,124:126-156.
- [8] XIE M J, ZHANG L F, MA J, et al. Functional alterations in cerebrovascular K^+ and Ca^{2+} channels are comparable between simulated microgravity rat and SHR[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005,289(3): 1265-1276.
- [9] WANG Y C, LU D Y, SHI F, et al. Clinorotation enhances autophagy in vascular endothelial cells[J]. *Biochem Cell Biol*, 2013,91(5): 309-314.
- [10] LI C F, SUN J X, GAO Y, et al. Clinorotation-induced autophagy via HDM2-p53-mTOR pathway enhances cell migration in vascular endothelial cells[J]. *Cell Death Dis*, 2018,9(2):147.

- [11] SHI F, ZHAO T Z, WANG Y C, et al. The impact of simulated weightlessness on endothelium-dependent angiogenesis and the role of caveolae/caveolin-1[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016,38(2):502–513.
- [12] SHI F, WANG Y C, ZHAO T Z, et al. Effects of simulated microgravity on human umbilical vein endothelial cell angiogenesis and role of the PI3K-Akt-eNOS signal pathway[J]. *PLoS One*, 2012,7(7):e40365.
- [13] SHI F, WANG Y C, HU Z B, et al. Simulated microgravity promotes angiogenesis through RhoA-Dependent rearrangement of the actin cytoskeleton[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017,41(1):227–238.
- [14] WANG Y C, ZHANG S, DU T Y, et al. Clinorotation upregulates inducible nitric oxide synthase by inhibiting AP-1 activation in human umbilical vein endothelial cells[J]. *J Cell Biochem*, 2009,107(2):357–363.
- [15] ZHANG LF. Region-specific vascular remodeling and its prevention by artificial gravity in weightless environment[J]. *Eur J Appl Physiol*, 2013,113(12):2873–2895.
- [16] 林乐健, 暴军香, 白云刚, 等. 模拟失重大鼠大脑中动脉与肠系膜小动脉肌源性紧张度的不同影响[J]. *生理学报*, 2009,61(1):27–34.
- [17] GAO F, BAO J X, XUE J H, et al. Regional specificity of adaptation change in large elastic arteries of simulated microgravity rats[J]. *Acta Physiol Hung*, 2009,96(2):167–187.
- [18] JACOT J G, WONG J Y. Endothelial injury induces vascular smooth muscle cell proliferation in highly localized regions of a direct contact co-culture system[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2008,52(1):37–46.
- [19] LOOMIS Z, EIGENBERGER P, REDINIUS K, et al. Hemoglobin induced cell trauma indirectly influences endothelial TLR9 activity resulting in pulmonary vascular smooth muscle cell activation[J]. *PLoS One*, 2017,12(2):e0171219.
- [20] JANSEN F, STUMPF T, PROEBSTING S, et al. Inter-cellular transfer of miR-126-3p by endothelial microparticles reduces vascular smooth muscle cell proliferation and limits neointima formation by inhibiting LRP6[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2017,104:43–52.
- [21] PAN Q, LIU H, ZHENG C, et al. Microvesicles derived from inflammation-challenged endothelial cells modulate vascular smooth muscle cell functions[J]. *Front Physiol*, 2017,7:692.
- [22] CHEN L J, CHUANG L, HUANG Y H, et al. MicroRNA mediation of endothelial inflammatory response to smooth muscle cells and its inhibition by atheroprotective shear stress[J]. *Circ Res*, 2015,116(7):1157–1169.
- [23] GOROG P, KOVACS I B. Inhibition of vascular smooth muscle cell migration by intact endothelium is nitric oxide-mediated; interference by oxidized low density lipoproteins[J]. *J Vasc Res*, 1998,35:165–169.
- [24] AXEL D I, RIESSEN R, ATHANASIADIS A, et al. Growth factor expression of human arterial smooth muscle cells and endothelial cells in a transfilter co-culture system[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997,29(11):2967–2978.
- [25] ZHANG Y, LAU P, PANSKY A, et al. The influence of simulated microgravity on purinergic signaling is different between individual culture and endothelial and smooth muscle cell coculture[J]. *Biomed Res Int*, 2014,2014:413708.

(2018-12-28 收稿, 2019-03-08 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 张启芳

(上接第 273 页)

- [17] MARELLI F, PERSANI L. Role of Jagged1-Notch pathway in thyroid development[J]. *J Endocrinol Invest*, 2018,41(1):75–81.
- [18] XIA Y, BHATTACHARYYA A, ROSZELL E E, et al. The role of endothelial cell-bound Jagged1 in Notch3-induced human coronary artery smooth muscle cell differentiation[J]. *Iomaterials*, 2012,33(8):2462–2472.
- [19] WU X, ZOU Y, ZHOU Q, et al. Role of Jagged1 in arterial lesions after vascular injury[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011,31(9):2000–2006.
- [20] LI S, LIU M, WANG Y, et al. Influence of space conditions on photosynthetic pigment contents and chloroplast ultrastructure of maize leaves[J]. *Space Med Med Eng*, 1998,11(6):396–400.
- [21] TAKAHASHI A, SUZUKI H, OMORI K, et al. Expression of p53-regulated proteins in human cultured lymphoblastoid TSCE5 and WTK1 cell lines during spaceflight[J]. *J Radiat Res*, 2012,53(2):168–175.
- [22] LUO H, ZHU B, ZHANG Y, et al. Tissue-engineered nerve constructs under a microgravity system for peripheral nerve regeneration[J]. *Tissue Eng Part A*, 2015,21(1–2):267–276.
- [23] MA Y C, SHI C, ZHANG Y N, et al. The tyrosine kinase c-Src directly mediates growth factor-induced Notch-1 and Furin interaction and Notch-1 activation in pancreatic cancer cells[J]. *PLoS One*, 2012,7(3):e33414.
- [24] TORITSUKA M, KIMOTO S, MURAKI K, et al. Regulation of striatal dopamine responsiveness by Notch/RBP-J signaling[J]. *Transl Psychiatry*, 2017,7(3):e1049.
- [25] MORROW D, GUHA S, SWEENEY C, et al. Notch and vascular smooth muscle cell phenotype[J]. *Circ Res*, 2008,103(12):1370–1382.

(2018-12-28 收稿, 2019-03-02 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 张启芳