

# caveolin - 1 抑制转化生长因子 - $\beta$ 1 诱导的哮喘大鼠气道平滑肌细胞的增殖

李凤琴 戴元荣 吴立琴 王瑞丽 夏梦玲

**摘要** 目的 探讨 TGF -  $\beta$ 1 对哮喘气道平滑肌细胞增殖的影响及 caveolin - 1 在 TGF -  $\beta$ 1 诱导的哮喘大鼠气道平滑肌细胞增殖中的抑制作用。方法 离体培养大鼠气道平滑肌细胞并进行分组,用 CCK - 8 法检测 1、10、100  $\mu$ g/L 的 TGF -  $\beta$ 1 作用后及 ERK 通路特异性抑制剂 PD98059 干预后各组 ASMCs 的增殖情况,用 Western blot 法检测 PD98059 及  $\beta$  - 环糊精干预后 caveolin - 1、p - ERK1/2 蛋白表达的情况。结果 10  $\mu$ g/L 的 TGF -  $\beta$ 1 刺激 ASMCs 增殖的作用最为显著 ( $P < 0.05$ ),PD98059 干预后,ASMCs 增殖明显减少 ( $P < 0.05$ )。TGF -  $\beta$ 1 刺激 ASMCs 增殖过程中,caveolin - 1 蛋白表达量减少,p - ERK1/2 的表达增加 ( $P < 0.05$ );使用  $\beta$  - 环糊精破坏微囊的结构后,caveolin - 1 表达量减少,而 p - ERK1/2 表达量增加 ( $P < 0.05$ )。结论 caveolin - 1 可以抑制 TGF -  $\beta$ 1 诱导的 ASMC 增殖,这种抑制作用可能是通过抑制 ERK1/2 通路来实现的。

**关键词** Caveolin - 1 转化生长因子 -  $\beta$ 1 平滑肌 增殖

[中图分类号] R5 [文献标识码] A

**Caveolin - 1 Abrogates TGF -  $\beta$ 1 - induced ASMCs Proliferation in Asthmatic Rats.** Li Fengqin, Dai Yuanrong, Wu Liqin, et al. Department of Respiratory Medical, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

**Abstract Objective** To investigate the effect of the transforming growth factor -  $\beta$ 1 (TGF -  $\beta$ 1) on airway smooth muscle cells (ASMCs) proliferation and the repressive effect of caveolin - 1 on TGF -  $\beta$ 1 - induced ASMCs proliferation of asthmatic rats. **Methods** Airway smooth muscle cells in vitro of rats were cultured. CCK - 8 method was used to detect cell proliferation and Western blot method was used to detect the expression of caveolin - 1 and p - ERK1/2 protein. **Results** CCK - 8 assay showed that the proliferation of ASMCs was related with TGF -  $\beta$ 1 concentration to some extent, while its significant effect was the concentration of 10  $\mu$ g/L ( $P < 0.05$ ). With the treatment of PD98059, the proliferation of ASMCs decreased significantly ( $P < 0.05$ ). After treatment of ASMC with TGF -  $\beta$ 1 and  $\beta$  - CD, the expression of caveolin - 1 in ASMC decreased significantly, while the expression of p - ERK1/2 increased. **Conclusion** Caveolin - 1 suppressed the effect of TGF -  $\beta$ 1 - induced ASMCs proliferation of asthmatic rats, which may be involved with ERK1/2 pathway.

**Key words** Caveolin - 1; TGF -  $\beta$ 1; Smooth muscle; Proliferation

微囊(caveolae)是细胞膜上形似烧瓶样的特化的膜结构,caveolin - 1是微囊标志性的结构蛋白,对许多关键信号分子的活性状态起着直接的调节作用,被认为是“广谱”的激素酶抑制剂<sup>[1]</sup>。转化生长因子 -  $\beta$ 1(transforming growth factor -  $\beta$ 1,TGF -  $\beta$ 1)能刺激气道平滑肌细胞(airway smooth muscle cells, ASMCs)的分裂与增殖。有研究显示,caveolin - 1能通过抑制 ASMCs 的增殖来影响哮喘的气道重塑,但具体的机制尚不明确。本研究首先探讨了 TGF -  $\beta$ 1对 ASMCs 增殖的影响,并给予  $\beta$  - 环糊精及 ERK 特异性抑制剂 PD98059 干预,探讨 caveolin - 1 在 TGF

-  $\beta$ 1 诱导 ASMC 增殖中的抑制作用。进一步为 TGF -  $\beta$ 1 在的信号转导途径中提供新的作用位点,同时有利于阐明 caveolin - 1 在 ASMC 中的生理功能。

## 材料与方法

1. 实验动物与试剂:SPF 级雄性 SD 大鼠购自上海实验动物中心,体重 100 ~ 120g,实验动物许可证号:SYXK(浙)2010 - 0150, TGF -  $\beta$ 1 购自美国 PeproTech 公司,RPMI 1640 培养基购自美国 HyClone 公司,优质胎牛血清购自杭州四季青公司,I 型胶原酶购自美国 Sigma 公司,胰酶细胞消化液、青链霉素购自江苏碧云天生物工程有限公司,ECL 试剂盒购为 Gene 公司产品,caveolin - 1 抗体、FITC 标记的山羊抗兔的二抗购自美国 Abcam 公司,GAPDH 抗体、FITC 标记的山羊抗小鼠的二抗购自苏碧云天生物工程有限公司。

2. 气道平滑肌细胞培养:参照 Palmans 等<sup>[2]</sup>的方法建立大鼠慢性哮喘的模型成功后,将正常和哮喘大鼠利用组织块贴壁法进行 ASMCs 的培养。待细胞长满后用胰酶细胞消化

基金项目:浙江省卫生厅基金资助项目(2009A144)

作者单位:325000 温州医科大学附属第二医院呼吸内科

通讯作者:戴元荣,电子信箱:daiyr@126.com

液传代。取 3~6 代细胞进行实验。实验所用的 ASMC 用 SM $\alpha$ -actin 抗体, SABC 免疫组化法进行鉴定。

3. 透射电镜观察微囊:将培养瓶中培养的 3~6 代细胞用胰酶消化为单细胞悬液,移入离心管中,1000r/min 离心 5min,弃去上清液,用 4℃ 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,1000r/min 离心 5min,弃去上清液,可见到米粒大小的细胞团块。在离心管中加入适量的 2.5% 戊二醛溶液,并轻轻摇晃使细胞团块充分接触戊二醛溶液,将标本放入 4℃ 冰箱过夜固定;将标本移入 EP 管内,用 0.1mol/L 磷酸缓冲液洗涤细胞团块,15min $\times$ 3 次;标本中加入 1% 的四氧化锇酸,37℃ 温箱放置 1h;用 0.1mol/L 磷酸缓冲液洗涤细胞团块,15min $\times$ 3 次。加入 1% 的醋酸铊,37℃ 温箱放置 1h。细胞梯度脱水,将标本放入 50%、70%、80%、90% 丙酮各 15min $\times$ 1 次,100% 丙酮 10min $\times$ 2 次。丙酮和环氧树脂包埋剂按 1:1 加入标本中,置于 37℃ 烤箱 2h;丙酮和环氧树脂包埋剂按 1:4 加入标本中,置于 37℃ 烤箱过夜;环氧树脂包埋剂 45℃ 烤箱放置 2h;标本包埋聚合,45℃ 烤箱放置 3h,65℃ 烤箱放置 48h。切片拍摄照片观察并记录。

4. CCK-8 法检测 ASMCs 的增殖:取 3~6 代细胞,消化、离心后,用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基将细胞调至浓度为  $(4\sim 5)\times 10^3$ /ml 的混悬液,然后接种于 96 孔板,每孔 100 $\mu$ l,待细胞 80%~90% 融合后,换无血清 RPMI 1640 继续培养 24h,使细胞同步于 G<sub>0</sub> 期,换用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养。研究不同浓度 TGF- $\beta$ 1 刺激 ASMCs 后的增殖情况,随机将细胞分 5 组:①正常对照组:培养的正常 ASMCs,不加任何干预;②哮喘组:培养的哮喘 ASMCs,不加任何干预;③、④、⑤ 组为不同浓度 TGF- $\beta$ 1 干预组,培养的哮喘 ASMCs,每孔加入终浓度为 1、10、100 $\mu$ g/L 的 TGF- $\beta$ 1。研究 PD98059 干预后 ASMCs 的增殖情况,随机将细胞分 4 组:①正常对照组;②哮喘组;③ TGF- $\beta$ 1 (10 $\mu$ g/L) 组;④ PD98059 + TGF- $\beta$ 1 (10 $\mu$ g/L) 组,TGF- $\beta$ 1 干预前加入 PD98059 预处理 1h。培养结束时,再每孔中加入 10 $\mu$ l 的 CCK-8,混匀后继续置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 1~2h,注意避光操作。酶联免疫检测仪 450nm 波长测定各孔 OD 值。每组设 4 个复孔,实验重复 4 次。

5. Western blot 法检测 ASMCs 上 caveolin-1、p-ERK1/2 的表达:检测蛋白表达情况,将离体培养的大鼠 ASMCs 随机分 5 组:① TGF- $\beta$ 1 (10 $\mu$ g/L) 组;②哮喘组;③正常对照组;④ PD98059 + TGF- $\beta$ 1 (10 $\mu$ g/L) 组;⑤  $\beta$ -环糊精 + TGF- $\beta$ 1 (10 $\mu$ g/L) 组 [ $\beta$ -CD + TGF- $\beta$ 1 (10 $\mu$ g/L) 组],TGF- $\beta$ 1 干预前加入  $\beta$ -环糊精预处理 1h。培养结束后,提取各组细胞总蛋白质,以 BCA 法进行蛋白定量。按每孔 40 $\mu$ g 蛋白量加样进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,将分离的蛋白转膜至 PVDF 膜后,以 5% 脱脂奶粉室温封闭 1~2h,分别加兔抗大鼠 caveolin-1 抗体 (1:1000)、p-ERK1/2 (1:1000) 及小鼠抗大鼠 GAPDH 抗体 (1:5000) 孵育,4℃ 过夜。TBST 洗膜后加辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗 (1:2000) 及山羊抗小鼠二抗 (1:3000),室温孵育 1~2h,洗膜,ECL 显影。用 AlphaEaseFC

4.0 软件分析目的蛋白 caveolin-1、p-ERK1/2 和内参 GAPDH 及 ERK 的吸光度值,以目的蛋白和内参的吸光度的比值代表目的蛋白的相对含量。

6. 统计学方法:实验数据用均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示,应用 SPSS 17.0 及 GraphPad Prism5 统计学软件进行统计分析。组间比较采用单因素方差分析,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。变量的相关程度用直线相关分析法分析。

## 结 果

1. 透射电镜观察 ASMCs 上微囊:透射电镜下可观察到正常大鼠 ASMCs 的细胞膜上含量丰富,大小形态多变的向内凹陷所形成的囊泡样结构,而哮喘大鼠 ASMCs 的细胞膜上其含量明显匮乏,结构破坏严重,哮喘组 ASMCs 上 caveolin-1 的表达量明显少于正常对照组 (图 1)。

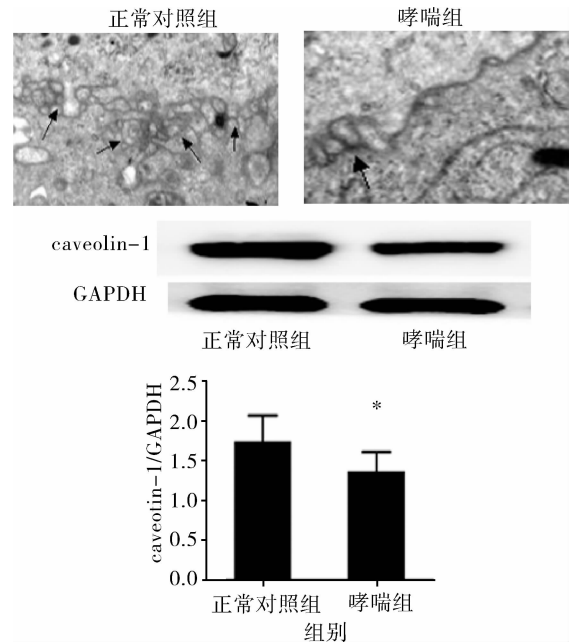


图 1 透射电镜观察 ASMCs 上微囊的形态

与正常对照组比较,\* $P<0.05$

2. CCK-8 法检测 ASMCs 的增殖:不同浓度的 TGF- $\beta$ 1 刺激 ASMCs 后其增殖情况相比较,哮喘组较正常对照组,细胞增殖明显 ( $P<0.05$ ),TGF- $\beta$ 1 (10 $\mu$ g/L) 组和 TGF- $\beta$ 1 (100 $\mu$ g/L) 组较 TGF- $\beta$ 1 (1 $\mu$ g/L) 组对 ASMCs 增殖作用明显增加 ( $P<0.05$ ),TGF- $\beta$ 1 (10 $\mu$ g/L) 组和 TGF- $\beta$ 1 (100 $\mu$ g/L) 组比较,增殖作用无统计学差异 ( $P>0.05$ ),详见图 2A。PD98059 干预后 ASMCs 的增殖情况相比较,TGF- $\beta$ 1 (10 $\mu$ g/L) 组较正常对照组和哮喘组细胞增殖明显 ( $P<0.05$ );PD98059 + TGF- $\beta$ 1 (10 $\mu$ g/L) 组较 TGF- $\beta$ 1 (10 $\mu$ g/L) 组细胞增殖减少 ( $P<0.05$ ),详见图 2B。

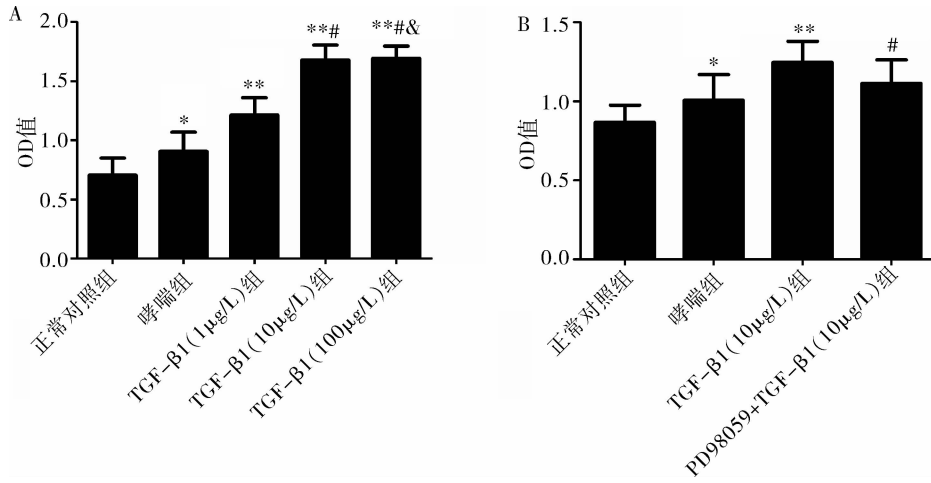


图 2 CCK-8 法检测 ASMCs 的增殖

A. 不同浓度 TGF-β1 刺激 ASMCs 后的增殖情况。与正常对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与哮喘组比较, \*\*  $P < 0.05$ ; 与 TGF-β1 (1 μg/L) 组比较, #  $P < 0.05$ ; 与 TGF-β1 (10 μg/L) 组比较, &  $P < 0.05$ 。B. PD98059 干预后 ASMCs 的增殖情况。与正常对照组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与正常对照组和哮喘组比较, \*\*  $P < 0.05$ ; 与 TGF-β1 (10 μg/L) 组比较, #  $P < 0.05$

3. Western blot 法检测 ASMCs 上 caveolin-1 的表达: TGF-β1 (10 μg/L) 刺激 ASMCs 增殖过程中, caveolin-1 蛋白表达量减少, p-ERK1/2 的表达增加 ( $P < 0.05$ )。β-CD 干预后, caveolin-1 及表达量少, p-ERK1/2 表达量增加 ( $P < 0.05$ )。见表 1 及图 3。相关性分析: caveolin-1 蛋白含量与 p-ERK1/2 蛋白含量呈负相关 ( $r = -0.528, P < 0.05$ ), 细胞增殖与 caveolin-1 蛋白含量呈负相关 ( $r = -0.847, P < 0.05$ ), 细胞增殖与 p-ERK1/2 蛋白含量呈正相关 ( $r = 0.903, P < 0.05$ )。

表 1 Western blot 法检测各组 ASMCs 中 caveolin-1 及 p-ERK1/2 的吸光度值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	caveolin-1	p-ERK1/2
TGF-β1 (10 μg/L) 组	6	0.67 ± 0.19	2.14 ± 0.14
哮喘组	6	1.26 ± 0.15*	1.33 ± 0.13*
正常组	6	2.03 ± 0.16*	0.42 ± 0.09*
PD98059 + TGF-β1 (10 μg/L) 组	6	1.18 ± 0.13	0.97 ± 0.08*
β-CD + TGF-β1 (10 μg/L) 组	6	0.46 ± 0.14*	1.03 ± 0.69*
F		95.74	309.56
P		< 0.05	< 0.05

与 TGF-β1 (10 μg/L) 组比较, \*  $P < 0.05$

### 讨 论

ASMCs 增殖在哮喘气道重塑中占有十分重要的地位, 可导致不可逆的气道狭窄<sup>[3,4]</sup>。caveolin-1 主要表达于平滑肌上, 借助于其穿梭于细胞膜的独特结构及氨基酸链末端的脚手架样结构, 对细胞内外的联系发挥着很大的作用<sup>[5]</sup>。研究证实微囊上有转化生长因子 β 受体 (transforming growth factor-β receptor,

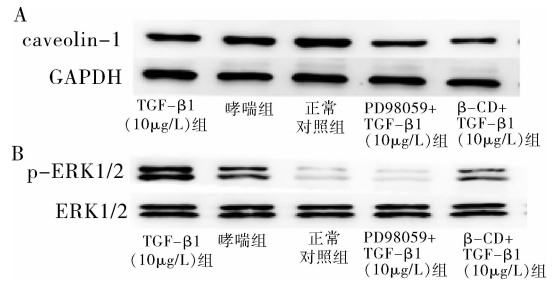


图 3 Western blot 法检测各组 ASMCs 中 caveolin-1 和 p-ERK1/2 的表达

TβR) 的存在<sup>[6]</sup>。TGF-β1 是致呼吸道重塑的重要细胞因子, Cohell 等发现, 支气管肺泡灌洗液中 TGF-β1 的水平, 哮喘患者发作期较控制期明显增高; 在中重度哮喘患者气道黏膜活检标本中, TGF-β1 mRNA 和 TGF-β1 过度表达<sup>[7-9]</sup>。Ward 等<sup>[10]</sup> 研究指出, TGF-β1 的表达水平不与哮喘症状相伴随, 而是与气道狭窄有关, 是引起哮喘气道重塑的关键介质。本实验也发现哮喘大鼠 ASMCs 的增殖较正常大鼠明显, 同时通过不同浓度的 TGF-β1 对哮喘大鼠 ASMCs 进行刺激发现, 其可以在一定浓度范围内可刺激 ASMCs 的增殖, 由此说明 TGF-β1 可促进 ASMCs 的增殖来引起气道重塑。

TGF-β1 信号通路发挥作用主要是通过微囊上的 TβR 的相互作用, caveolin-1 作为微囊上的主要结构蛋白, 其也参与了该过程。有研究证实, 通过脂筏介导的 TβR 的内化和 (或) caveolin-1 介导的 TβR 的内吞作用可促进受体的降解, 进而抑制细胞信号<sup>[11-13]</sup>。而细胞外信号调节激酶 (ERK) 是 TGF-

$\beta 1$  调节 ASMCs 增殖和凋亡的一条重要途径<sup>[14]</sup>。本实验通过 ERK 特异性抑制剂干预后, TGF -  $\beta 1$  诱导的细胞增殖是明显减少的, 同时 Western blot 法检测发现胆固醇剔除剂  $\beta$  - 环糊精破坏微囊后, 使 p - ERK 明显增加, 促进了细胞的增殖, 且在 TGF -  $\beta 1$  促进 ASMCs 增殖过程中, caveolin - 1 蛋白表达量是明显下降的。这些都表明 caveolin - 1 在 TGF -  $\beta 1$  诱导 ASMC 增殖过程中发挥着负性调控作用。

此外, 实验中用透射电镜观察到哮喘大鼠 ASMCs 上的微囊较正常组含量匮乏, 结构破坏严重, Western blot 法检测到哮喘大鼠 ASMCs 上的 caveolin - 1 表达量明显减少, 说明 caveolin - 1 在维持了正常 ASMCs 细胞膜的完整性。

综上所述, caveolin - 1 可以抑制 TGF -  $\beta 1$  刺激 ASMCs 的增殖过程, ERK 通路介导了该过程。这将有助于阐明 caveolin - 1 在 ASMCs 中的生理功能, 为进一步明确 TGF -  $\beta 1$  的信号转导途径提供新的切入点。

参考文献

- 1 Rybin VO, Xu X, Steinberg SF. Activated protein kinase C isoforms target to cardiomyocyte caveolae: stimulation of local protein phosphorylation[J]. Circ Res, 1999, 84(9): 980 - 988
- 2 Palmans E, Kips JC, Pauwels RA. Prolonged allergen exposure induces structural airway changes in sensitized rats[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2000, 161(2): 627 - 635
- 3 Munakata M. Airway remodeling and airway smooth muscle in asthma [J]. Allergol Int, 2006, 55(3): 235 - 243
- 4 Cohn L, Elias JA, Chupp GL. Asthma: mechanism of disease persistence and progression[J]. Annu Rev Immunol, 2004, 22(1): 789 -

- 815
- 5 Halayko AJ, Tran T, Gosens R. Phenotype and functional plasticity of airway smooth muscle: role of caveolae and caveolin - 1 [J]. Proc Am Thorac Soc, 2008, 5(1): 80 - 88
- 6 Miyasato SK, Loeffler J, Shohet R, et al. Caveolin - 1 modulates TGF -  $\beta 1$  signaling in cardiac remodeling [J]. Matrix Biol, 2011, 30(5 - 6): 318 - 329
- 7 Miyazono K, Dijke PT, Heldin CH, et al. TGF - beta signaling by smad protein [J]. Adv Immunol, 2000, 75(1): 115 - 157
- 8 Cohell P, Rajah R, Rosenbloom J, et al. IGFBP23 mediates TGF - beta - 1 - induced cellgrowth in human airway smooth muscle cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 278(3): 545 - 551
- 9 Puddicombe SM, Richter A, Richter H, et al. Increased expression of P21(waf) cyclin2 dependen kinase inhibitor in asthmatic bronchial epithelium [J]. Am J Re Spir Cell Mol, 2003, 28(1): 61 - 68
- 10 Ward KR, Crew GM, Kenyon NJ, et al. TGF -  $\beta 1$  causes airway fibrosis and increased collagen I and II mRNA in mice [J]. Thorax, 2003, 58(9): 772 - 777
- 11 Derynck R, Zhang YE. Smad - dependent and Smad - indepent pathways in TGF - beta family signaling [J]. Nature, 2003, 425(6958): 577 - 584
- 12 Schmierer BM, Hill CS. TGFbeta - SMAD signal transduction: molecular specificity and function flexibility [J]. Nat Mol Cell Biol, 2007, 8(12): 970 - 982
- 13 Zhao B, Wang Q, Du J, et al. PICK1 promotes caveolin - dependent degradation of TGF -  $\beta$  type I receptor [J]. Cell Res, 2012, 22(10): 1467 - 1478
- 14 Bai J, Liu XS, Xu YJ, et al. Regulation of cell proliferation and apoptosis by ERK signaling pathway in airway smooth muscle cells of rats [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biol, 2007, 23(1): 38 - 44

(收稿日期: 2014 - 01 - 22)  
(修回日期: 2014 - 03 - 18)

## 经胸腔镜建立巴马小型猪慢性心肌缺血模型

张 波 陈保富 马德华 王益兵 叶敏华 夏利龙 陈 宇 王 斌 王 铮 朱成楚

**摘 要** **目的** 本研究目的在于探索采用胸腔镜微创技术建立小型猪慢性心肌缺血模型。**方法** 选用实验用巴马小型猪, 采用胸腔镜技术, 在左冠状动脉回旋支(left circumflex coronary artery)主干放置 Ameroid 缩窄环, 术后第 6 周经选择性冠状动脉造影, 了解冠脉狭窄程度及侧支循环形成并行心脏核素显像了解心肌缺血情况, 以对胸腔镜下建立小型猪慢性心肌缺血模型进行评估。**结果** 造模成功率 80% (8/10), 手术时间 45.3 ± 7.1 min, 术中出血量 32.5 ± 11.3 ml。术后第 6 周造影显示 6 头左回旋支完全闭塞, 见侧支循环形成, 2 头狭窄程度大于 70%。心肌灌注显像见左后下壁明显缺损。**结论** 采用胸腔镜方式应用 Ameroid

基金项目: 浙江省实验动物科技计划项目 (2011C37083)

作者单位: 317000 浙江省台州医院心胸外科 (张波、陈保富、马德华、叶敏华、夏利龙、陈宇、朱成楚), 麻醉科 (王益兵), 心内科 (王斌), 核医学科 (王铮)

通讯作者: 朱成楚, 电子信箱: zhucc669266@163.com