

M - CSF 对卵泡颗粒细胞功能调节及其分子机制

张 薇 许 嵩 张治芬

摘 要 **目的** 探讨巨噬细胞集落刺激因子(M - CSF)对卵泡颗粒细胞的功能调节及其分子机制。**方法** 取2014年7月~2014年10月间,在浙江大学医学院附属妇产科医院接受体外受精 - 胚胎移植的30例因男性因素不孕妇女的卵泡液,患者平均年龄 30.8 ± 2.1 岁,提取颗粒细胞培养24h后,分为空白对照组、M - CSF组(10、25、50、100ng/ml rhM - CSF)、M - CSF + 来曲唑组(0、10、25、50、100ng/ml rhM - CSF + 10^{-6} mol/L 来曲唑)、FSH组(10、25、50、100IU/ml rhFSH)、FSH + 来曲唑组(0、10、25、50、100IU/ml rhFSH + 10^{-6} mol/L 来曲唑),继续培养24h,用ELISA法测定培养液 E_2 浓度,RT - PCR法测定颗粒细胞FSH受体mRNA及M - CSF受体mRNA的表达。取指数生长期的人卵巢肿瘤颗粒细胞系COV434,给予不同浓度(0、10、25、50、100ng/ml)的人重组M - CSF,于37℃、5% CO_2 温箱内培养24h,MTS比色实验测定细胞增殖率。用Western blot法检测rhM - CSF(50ng/ml)处理后COV434细胞MAPK通路相关蛋白的表达。**结果** 颗粒细胞培养液中雌二醇(E_2)浓度与rhM - CSF或rhFSH浓度呈正相关($P < 0.05$)。rhFSH在一定浓度范围(< 25 IU/ml)内可促进颗粒细胞M - CSF受体mRNA表达($P < 0.05$),与来曲唑联合作用后,不同浓度组颗粒细胞M - CSF受体mRNA的表达水平与对照组相比均明显升高($P < 0.05$)。rhM - CSF单独或与来曲唑联合作用,均可促进颗粒细胞FSH受体mRNA表达($P < 0.05$)。随着rhM - CSF浓度的升高,COV434细胞的增殖能力也呈上升趋势。50ng/ml浓度的rhM - CSF能以时间依赖的方式瞬间激活JNK及P38信号通路,分别使用JNK抑制剂SP600125、P38抑制剂SB203580预处理后,并不影响各组雌激素水平。**结论** M - CSF可能在促进颗粒细胞的增殖分化以及雌激素的合成分泌过程中起重要作用。

关键词 M - CSF FSH 颗粒细胞 雌激素**中图分类号** R71**文献标识码** A**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.01.025

Involvement of Macrophage Colony - stimulating Factor (M - CSF) in the Function of Follicular Granulosa Cells and Its Molecular Mechanism. Zhang Wei, Xu Song, Zhang Zhifen. Department of Gynecology, Hangzhou First People's Hospital, Nanjing Medical University, Zhejiang 310006, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of macrophage colony - stimulating factor(M - CSF) in follicular granulosa and its molecular mechanism. **Methods** Human luteinized granulosa cells(LCC) were isolated from follicular fluid of superovulated infertile patients(average age 30.8 ± 2.1 years old) undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. LCC were cultured with DMEM/F12 medium plus various concentration of M - CSF(0, 10, 25, 50, 100ng/ml), M - CSF + Letrozole(10^{-6} mol/L), FSH(0, 10, 25, 50, 100IU/mL), FSH + Letrozole(10^{-6} mol/L). Media were collected at 24 hours after culture and estradiol(E_2) in media were measured by ELISA. Expression levels of FSH receptor and M - CSF receptor were detected by quantitative RT - PCR. After cultured COV434 were treated with M - CSF, cell proliferation was quantified by MTs assay and protein expression was detected by Western blot. **Results** Either M - CSF or FSH stimulated the production of E_2 . The production of FSH receptors was enhanced by M - CSF or M - CSF + Letrozole in vitro in a dose - dependent manner. Conversely, FSH was able to promote the expression of the receptor of M - CSF when present in an appropriate concentration. With the increasing of M - CSF concentration, the cell proliferation of COV434 showed an upward trend. M - CSF induced phosphorylation of JNK and P38. The level of estradiol(E_2) in media didn't change when cells were pretreated with the JNK inhibitor SP600125 or P38 inhibitor SB203580. **Conclusion** M - CSF may play an important role in promoting the proliferation and differentiation of granulosa cell, also the synthesis and secretion of estrogen.

Key words M - CSF; FSH; Granulosa Cells (GCs); Estradiol

巨噬细胞集落刺激因子(M - CSF)是造血生长

因子,除了刺激巨噬细胞的增殖外,它还具有调节女性生殖细胞生长、增殖和分化的作用,已有研究发现卵泡颗粒细胞存在M - CSF自分泌系统,其合成分泌受促卵泡激素(FSH)及雌二醇(E_2)调控,且 E_2 分泌也受M - CSF调控^[1]。本研究通过测定颗粒细胞表

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y2090796)

作者单位:310002 杭州市第一人民医院(张薇、许嵩);310008 杭州市妇产科医院(张治芬)

通讯作者:张治芬,电子信箱:zhangzf@zju.edu.cn

面 FSH 受体 mRNA 及 M - CSF 受体 mRNA 的表达,进一步探讨 FSH、M - CSF 和 E₂ 之间错综复杂的交互关系,同时研究 M - CSF 调节颗粒细胞功能的可能信号通路机制,从而更深刻地揭示 M - CSF 与颗粒细胞相互调控的全貌。

资料与方法

1. 资料来源:人卵泡颗粒细胞取自 2014 年 7 月~2014 年 10 月间,在浙江大学医学院附属妇产科医院接受体外受精 - 胚胎移植的 30 例因男性因素不孕的妇女,患者平均年龄 30.8 ± 2.1 (26 ~ 33) 岁,月经周期正常。

2. ELISA 法测定:rhM - CSF、rhFSH 及联合来曲唑作用下卵泡颗粒细胞培养液中 E₂ 浓度,RT - PCR 法测定体外培养颗粒细胞 FSH 受体 mRNA 及 M - CSF 受体 mRNA 表达。(1)细胞的分离和培养:以上妇女经肌内注射人绒毛膜促性腺激素(hCG)后 34 ~ 36h 在阴道超声探头引导下经阴道取卵,将取出卵泡后的卵泡液分装至 15ml 离心管离心(1000r/min, 10min),吸取上层白色细胞,加 I 型胶原酶(Sigma 公司)3 ~ 5ml 37℃ 水浴锅中消化 20 ~ 30min,上述液体移至等体积 50% Percoll(Pharmacia 公司)上层再次离心(2000r/min, 10min),取两层液体间的颗粒细胞层,移至另一含 10% 胎牛血清血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)DMEM/F12 培养液(Gibco 公司)的离心管中,混匀,离心(500r/min, 5min)。吸除上清液,加 DMEM/F12 混匀,细胞计数,按活细胞密度 2 × 10⁵/ml 种植至 6 孔板中,每孔 1ml,置于 37℃、5% CO₂ 孵育箱中培养。(2)rhM - CSF、rhFSH 及联合来曲唑作用下卵泡颗粒细胞培养液中 E₂ 浓度,颗粒细胞 FSH 受体 mRNA 及 M - CSF 受体 mRNA 表达的测定:颗粒细胞培养 24h 后用 10% 胎牛血清 DMEM/F12 培养基换液,分为空白对照组、M - CSF 组:加入浓度为 10、25、50、100ng/ml rhM - CSF(R&D 公司)、M - CSF + 来曲唑组:加入浓度为 0、10、25、50、100ng/ml rhM - CSF + 10⁻⁶mol/L 来曲唑(美仑公司)、FSH 组:加入浓度为 10、25、50、100IU/ml rhFSH(R&D 公司)、FSH + 来曲唑组:加入浓度 0、10、25、50、100IU/ml rhFSH + 10⁻⁶mol/L 来曲唑,继续培养 24h,培养液 2000r/min 离心 20min 取上清液,ELISA 法(Cloude - Clone E₂ 检测试剂盒)测定培养液 E₂ 浓度,TRIpure Reagent 总 RNA 抽提试剂(北京百泰克生物技术有限公司)提取总 RNA,样本在梯度 PCR 仪上用 TaKaRa PrimeScript TM RT Master Mix (Perfect Real Time) 反

转录试剂盒进行反应,将反转录好的 cDNA 样本在 7500 Fast Real - Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) 用 TaKaRa PCR 扩增试剂盒 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] kit 进行扩增,检测目的基因表达量,扩增程序:预变性,Repeat:1,95℃ 2min,PCR 反应,Repeat:39,95℃ 10s,60℃ 30s。以上实验重复 3 次,每次每种调控因素重复 3 孔。PCR 反应结束后根据扩增曲线和溶解曲线判断反应是否成功,CT 值为目的基因的 PCR 反应循环数。引物由大连 TaKaRa 公司合成,序列见表 1。

表 1 目标基因引物序列 ($\bar{x} \pm s$)

目标基因	引物序列(5'→3')
FSH 受体	CATCATCGGATCTGTCACTGCTCTA
	CTCGAAGCTTGCTGAGGACAAAC
M - CSF 受体	CCAAGTTTCATTGAGCCAGGACTA
	TCTGCAGGCACCACTGTCAAG
β - actin	CATGTACGTTGCTATCCAGGC
	CTCCTTAATGTACGCACGAT

3. MTS 比色实验测定细胞增殖率:将指数生长长期的人卵巢肿瘤颗粒细胞系 COV434(中国科学院上海细胞所提供)稀释成 1.0 × 10⁵/ml,种于 96 孔培养板,每孔约 2.0 × 10³ 个细胞,分为 5 组,每组设 6 个复孔,细胞贴壁生长后,加入浓度为 0、10、25、50、100ng/ml 的人重组 M - CSF,培养板置于 37℃、5% CO₂ 温箱内培养 24h,以排枪每孔加入 20 μ l CellTiter 96 Aqueous One Solution Assay (Promega 公司),在 37℃、5% CO₂ 温箱内孵育 4h,酶标分析仪上测定其在 490nm 处的吸光度(A)值。计算公式:细胞增殖率(%) = (1 - 处理组 A490/对照组 A490) × 100%。以上实验重复 3 次。

4. Western blot 法检测 MAPK 通路 JNK、ERK1/2、P38 活性:取指数生长期的 COV434 细胞以 2.0 × 10⁵/孔接种于 6 孔板中,细胞贴壁生长后,加入 rhM - CSF (50ng/ml),不同时间点(0、15、30min、1、2、6h)收集细胞,提取蛋白,用博士德 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度后各取蛋白 50 μ g 变性,SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后电转移至硝酸纤维素膜,含有 5% 牛奶的 TTBS 缓冲液封闭 1h,PVDF 膜与小鼠抗人 p - JNK(CST 公司),兔抗人 p - ERK1/2(CST 公司),p - P38 单克隆抗体(CST 公司)(1:1000)4℃ 下孵育过夜,TBST15min 漂洗 3 次,加入羊抗鼠(博士德公

司),羊抗兔二抗(博士德公司)(1:1000)室温下孵育1h,TBST15min 漂洗3次,使用 Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate 显色剂显色,全自动凝胶成像分析仪器拍照。为校正总蛋白上样量一致,检测完上述磷酸化抗体后的膜以洗脱液(100mmol/L β -ME,2% SDS,62.5mmol/L Tris-HCl pH 6.7)于50℃洗脱30min,再用兔抗人 JNK、ERK1/2、P38 多克隆抗体(博士德公司)(1:1000)检测总 JNK、ERK1/2、P38 作为内对照,每组实验重复3次,p-JNK、p-ERK1/2、p-P38 代表被激活的 MAPK。

5. 统计学方法:使用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组之间比较采用配对 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表2 rhM-CSF 及 rhM-CSF 联合来曲唑作用下颗粒细胞培养液中 E_2 浓度

来曲唑 (mol/L)	rhM-CSF (ng/ml)				
	0	10	25	50	100
0	356.44 $\pm$ 44.33	475.32 $\pm$ 42.77 *	580.16 $\pm$ 41.81 *	686.48 $\pm$ 37.49 *	720.55 $\pm$ 31.65 *
10 ⁻⁶	55.07 $\pm$ 11.47	53.67 $\pm$ 9.77	58.74 $\pm$ 13.26	62.44 $\pm$ 11.23	64.54 $\pm$ 12.76

与0组相比,* $P < 0.05$

表3 rhFSH 及 rhFSH 联合来曲唑作用下颗粒细胞培养液中 E_2 浓度

来曲唑 (mol/L)	rhFSH (IU/ml)				
	0	10	25	50	100
0	443.42 $\pm$ 34.36	715.29 $\pm$ 21.92 *	815.82 $\pm$ 55.33 *	963.32 $\pm$ 74.06 *	1154.24 $\pm$ 70.50 *
10 ⁻⁶	65.53 $\pm$ 13.15	67.01 $\pm$ 11.68	63.28 $\pm$ 13.01	69.36 $\pm$ 12.00	74.18 $\pm$ 11.31

与0组相比,* $P < 0.05$

2. rhM-CSF、rhFSH 及联合来曲唑作用下卵泡颗粒细胞 FSH 受体 mRNA 及 M-CSF 受体 mRNA 的表达:rhFSH 浓度达到 10、25IU/ml 时颗粒细胞 M-CSF 受体 mRNA 表达水平较空白组显著升高,且差异有统计学意义($P < 0.05$,图1),随着 rhFSH 浓度的进一步升高,颗粒细胞 M-CSF 受体 mRNA 表达显著下降,当 rhFSH 浓度达到 100IU/ml 时 M-CSF 受体 mRNA 表达水平较空白组显著下降($P < 0.05$)。rhFSH 与来曲唑联合作用下,不同浓度组颗粒细胞 M-CSF 受体 mRNA 的表达水平与空白组相比均显著升高($P < 0.05$,图1)。rhM-CSF 单独或与来曲唑联合作用,颗粒细胞 FSH 受体 mRNA 表达水平较空白组均显著升高($P < 0.05$,图2)。加用来曲唑后,FSH 受体 mRNA 的表达水平与单用 rhM-CSF 组相比略有下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$,图2)。

3. rhM-CSF 对颗粒细胞增殖能力的影响:当

结 果

1. rhM-CSF、rhFSH 及联合来曲唑作用下对卵泡颗粒细胞培养液中 E_2 浓度的影响:在不同浓度(0、10、25、50、100ng/ml)rhM-CSF 及(0、10、25、50、100IU/ml)rhFSH 作用下,颗粒细胞培养液中 E_2 浓度随 rhM-CSF 及 rhFSH 浓度的升高而升高,与空白组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。rhM-CSF 处理后各浓度组 E_2 浓度与空白组相比分别增加了 33.35%、62.76%、92.59%、102.15% ($P < 0.05$,表2),与之相比,rhFSH 处理组 E_2 浓度升高更为显著,分别增加 61.31%、83.98%、117.25%、160.30% ($P < 0.05$,表3)。来曲唑联合 rhM-CSF 及 rhFSH 共同作用后, E_2 浓度均下降至较低水平,且组间差异无统计学意义($P > 0.05$,表2、表3)。

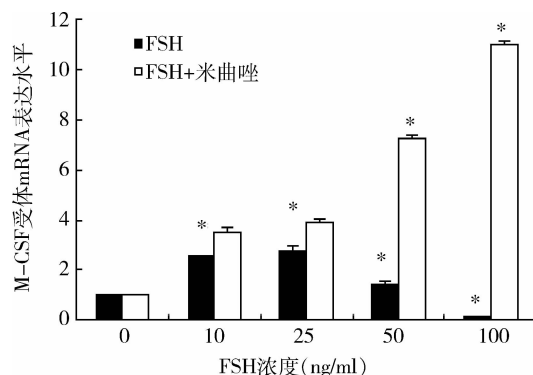


图1 FSH 及 FSH 联合来曲唑作用下卵泡颗粒细胞 M-CSF 受体 mRNA 的表达水平

与0组相比,* $P < 0.05$

rhM-CSF 浓度达到 25ng/ml 时,COV434 细胞增殖能力显著升高(增殖率为 112.89%),且与空白组相比差异有统计学意义($P < 0.05$,图3),随着浓度的进

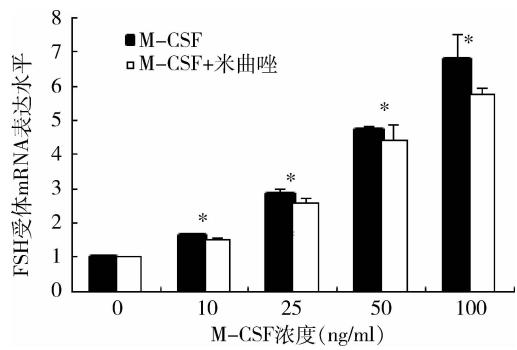


图 2 M - CSF 及 M - CSF 联合来曲唑作用下卵泡颗粒细胞 FSH 受体 mRNA 的表达水平
与 0 组相比, * $P < 0.05$

一步升高,颗粒细胞的增殖能力也呈上升趋势,增殖率分别达到 124.14% (50ng/ml) 及 132.32% (100ng/ml),表明 M - CSF 可促进颗粒细胞的增殖能力。

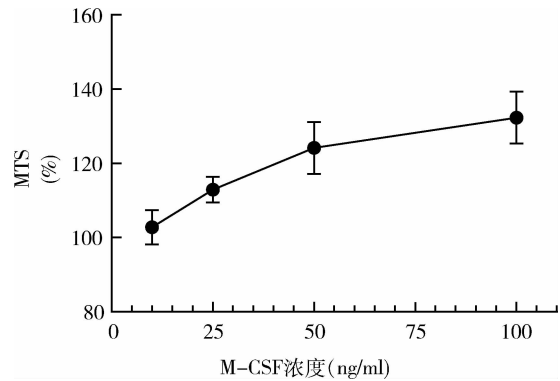
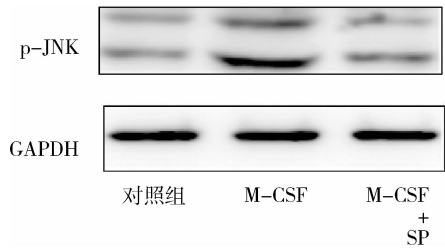


图 3 M - CSF 对颗粒细胞增殖能力的影响

4. rhM - CSF 对 JNK、ERK1/2 和 P38 信号通路的影响:50ng/ml浓度的 rhM - CSF能以时间依赖的



方式瞬间激活 JNK 及 P38 信号通路(图 4),使其磷酸化水平增高,但总蛋白表达水平未受影响,对 ERK1/2 通路则无明显激活作用。在 50ng/ml 浓度 rhM - CSF 作用下,30min JNK 通路轻度激活,1h 达到高峰,然后逐渐下降,到 6h 仍高于本底水平,15min P38 通路达到高峰,后逐渐下降,表明 M - CSF 可在不同时间内分别快速持续激活 JNK 及 P38 信号通路。分别使用 JNK 抑制剂 SP600125、P38 抑制剂 SB203580 与 COV434 细胞预先孵育 1h,再次用 Western blot 法检测 MAPK 通路相关蛋白 JNK、P38 的磷酸化水平,并用 ELISA 法检测培养液雌激素水平。结果显示,经过抑制剂预处理后,M - CSF 对 JNK、P38 磷酸化水平的激活作用被显著抑制(图 5)。但与空白组相比,3 组雌激素水平 (418.70 ± 60.20 、 420.23 ± 58.30 、 406.28 ± 54.84 pg/ml) 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

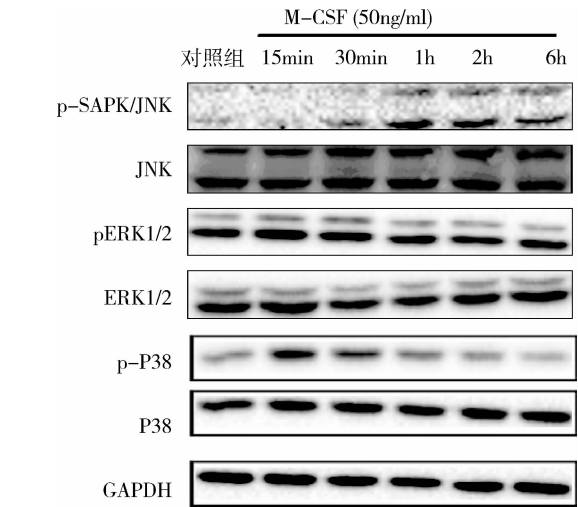


图 4 M - CSF 对 JNK、ERK1/2 和 P38 信号通路的影响

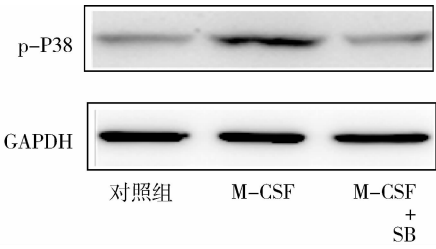


图 5 抑制剂处理后 M - CSF 对 JNK、P38 信号通路的影响

讨 论

细胞因子在生殖过程中所起的重要作用越来越引人瞩目^[2]。大量的研究表明,许多细胞因子对下丘脑 - 垂体 - 卵巢轴、卵泡发育、黄体功能、胚胎着床和发育乃至整个妊娠过程均有调节作用。巨噬细胞集落刺激因子 (M - CSF) 作为其中的一种,可由多种

细胞产生,其作用除了刺激巨噬细胞的增殖外,还调节包括生殖细胞在内的其他细胞的生长、增殖和分化,对维持卵巢功能和促进性激素的分泌有重要作用,甚至还有研究者认为 M - CSF 可促进人类早期胚胎发育^[3-5]。Schonlau 等^[6]的动物模型证实 M - CSF 可促进卵泡的生长和排卵。缺乏 M - CSF 基因的

OP/OP 小鼠动情周期延长,窦前卵泡及成熟卵泡减少,排卵率降低,注射 M-CSF 可使其动情周期恢复正常,发育的卵泡数增加,排卵率升高,并增加颗粒细胞的增殖能力。Sweet 等^[7]和 Chitu 等^[8]也有类似的报道,表明 M-CSF 参与了卵泡的发育和排卵过程。已有报道,人卵泡液中含有高水平的 M-CSF^[9]。笔者既往的研究也证实组成卵泡的最大细胞群——颗粒细胞具有分泌 M-CSF 的作用^[10]。

本研究显示,M-CSF 可促进颗粒细胞分泌 E_2 ,与浓度呈正相关,但作用弱于 FSH,这与之前的研究结果相一致^[11]。笔者进一步研究了 M-CSF、FSH 和 E_2 之间的交互关系,结果显示 FSH 低浓度时($< 25 \text{ IU/ml}$),颗粒细胞 M-CSF 受体 mRNA 的表达与 FSH 浓度呈正相关,但随 FSH 浓度的进一步上升,受体 mRNA 的表达呈下降趋势,考虑此时培养液中高浓度的雌激素水平可能对 M-CSF 受体表达造成影响,故而加入雌激素合成抑制剂来曲唑,以排除雌激素的干扰,结果显示随着 FSH 浓度的上升,M-CSF 受体 mRNA 的表达也呈上升趋势,表明 FSH 可以促进 M-CSFR 的表达,且高浓度的雌激素水平可对 M-CSFR 的表达起抑制作用,而 M-CSF 需与 M-CSFR 结合才能产生生物学效应,故由此推测,在卵泡发育早中期,M-CSF 可能与 FSH 存在协同作用,共同促进卵泡发育及雌激素的分泌,而到了卵泡晚期,随着体内雌激素浓度的进一步上升,抑制了 M-CSF 的分泌,以减少其与 FSH 的协同作用,防止卵泡的过度生长,以及避免 M-CSF 发挥其他的生物学效应,从而维持一定的稳态。基于 M-CSF 分泌的特性以及在卵泡发育和排卵过程中的重要作用,有研究者提出可以把不孕症患者体内 M-CSF 水平作为判断辅助生殖治疗是否成功的预测指标^[12]。

笔者的研究结果显示,颗粒细胞 FSH 受体 mRNA 的表达随 M-CSF 浓度的升高而升高,即使加入来曲唑后,这种升高的趋势也不被抑制,表明 M-CSF 可以通过直接作用于颗粒细胞而增加 FSHR 的表达,且不受雌激素浓度的影响,FSHR 是卵泡发育所必须的特异性受体,故而推测,M-CSF 可增加卵泡对 FSH 的敏感度。Takasaki 等^[13]对一部分卵巢低反应的不孕症患者进行 M-CSF 的临床应用,结果显示,同时使用 rhM-CSF 和 hMG 与单用 hMG 患者相比,卵泡发育的效果更好,尤其在早卵泡期血清 M-CSF 水平较低的患者中,此研究既说明促性腺激素与 M-CSF 之间存在相辅相成的作用,同时也首次在临

床治疗中验证了 M-CSF 的可行性。

笔者的研究还进一步探讨了 M-CSF 作用于颗粒细胞的可能信号转导途径,M-CSF 通过与具有高亲和力的跨膜酪氨酸激酶受体结合产生作用,M-CSF 与受体结合后,首先引起受体的二聚化以及胞质内酪氨酸激酶部分的磷酸化^[14]。目前已知 JAK/STAT、 PI_3K 、MAPK、DAG/PKC、Src 家族的激活都可能参与 M-CSF 的细胞内信号转导^[15,16]。笔者的研究发现,M-CSF 可以激活 JNK、P38 的磷酸化水平,分别使用 JNK 抑制剂 SP600125、P38 抑制剂 SB203580 预处理后,并不能抑制颗粒细胞分泌雌激素,这表明 JNK 和 P38 信号通路可能参与了 M-CSF 对颗粒细胞的作用,但同时也可能存在其他信号通路的参与,值得进一步深入研究。

总之,笔者的研究证实,在体外,卵泡颗粒细胞 M-CSF 的合成和分泌受 FSH 及 E_2 的调控,且 M-CSF 在维持卵泡的发育及促进颗粒细胞的增殖分化、雌激素的合成分泌过程中起重要作用。这为 M-CSF 成为一种新型卵泡发育调节剂提供理论依据,并为治疗卵泡发育障碍性不孕提供新的可能。

参考文献

- 1 张治芬, Salmassi A, Mettler L. 巨噬细胞集落刺激因子对卵泡颗粒黄体细胞性激素分泌的影响及其受体的测定[J]. 中华妇产科杂志, 2002, 37(6): 338-341
- 2 Ianchii RI, Voznesenska TI, Shepel OA, *et al.* Cytokines and their role in reproductive system[J]. Fiziol Zh, 2007, 53(3): 82-90
- 3 Luo J, Elwood F, Britschgi M, *et al.* Colony-stimulating factor 1 receptor(csf1r) signaling in injured neurons facilitates protection and survival[J]. J Exp Med, 2013, 210(1): 157-172
- 4 Zhang Z, Fang Q, Wang J. Involvement of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in the function of follicular GCs[J]. Fertil Steril, 2008, 90(3): 749-754
- 5 Kawamura K, Chen Y, Shu Y, *et al.* Promotion of human early embryonic development and blastocyst out growth in vitro using autocrine/paracrine growth factors[J]. PLoS One, 2012, 7(11): 1-10
- 6 Schonlau F, Schlesiger C, Ehrchen J, *et al.* Monocyte and macrophage functions in M-CSF-deficient op/op mice during experimental leishmaniasis[J]. J Leukoc Biol, 2003, 73(5): 564-573
- 7 Sweet MJ, Hume DA. CSF-1 as a regulator of macrophage activation and immune responses[J]. Arch Immunol Ther Exp: Warsz, 2003, 51(3): 169-177
- 8 Chitu V, Stanley ER. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation[J]. Curr Opin Immunol, 2006, 18(1): 39-48
- 9 Nishimura K, Tanaka N, Kawano T, *et al.* Change in macrophage colony-stimulating factor concentration in serum and follicular fluid in in-vitro fertilization and embryo transfer cycles[J]. Fertil Steril, 1998, 69(1): 53-57

- 10 张治芬, Salmassi A, Mettler L. 巨噬细胞集落刺激因子在卵泡黄素化颗粒细胞中的表达[J]. 中华妇产科杂志, 2002, 37(8):472 - 474
- 11 许嵩, 张治芬. M-CSF 对人卵巢颗粒细胞表达 FSH 与其受体的影响及相互作用研究[J]. 浙江医学, 2014, 36(17):1450 - 1453
- 12 Salmassi A, Mettler L, Jonat W, *et al.* Circulating level of macrophage colony-stimulating factor can be predictive for human in vitro fertilization outcome[J]. Fertil Steril, 2010, 93(1):116 - 123
- 13 Takasaki A, Ohba T, Okamura Y, *et al.* Clinical use of colony-stimulating factor-1 in ovulation induction for poor responders[J]. Fertil Steril, 2008, 90(6):2287 - 2290
- 14 Comalada M, Valledor AF, Sanchez-Tillo E, *et al.* Macrophage colony-stimulating factor-dependent macrophage proliferation is medi-

- ated through a calcineurin-independent but immunophilin-dependent mechanism that mediates the activation of external regulated kinases[J]. Eur J Immunol, 2003, 33(11):3091 - 3100
- 15 Lee AW, Mao Y, Penninger JM, *et al.* Gab2 promotes colony-stimulating factor 1-regulated macrophage expansion via alternate effectors at different stages of development[J]. Mol Cell Biol, 2011, 31(22):4563 - 4581
- 16 Popa-Wagner A, Balseanu AT, Rogalewski A, *et al.* Effects of granulocyte-colony stimulating factor after stroke in aged rats[J]. Stroke, 2010, 41(5):1027 - 1031

(收稿日期:2015-05-18)

(修回日期:2015-06-10)

自噬在晚期糖基化产物 (AGEs) 诱导血管平滑肌细胞增殖与迁移中的作用

胡鹏飞 周 辉 陆 明 黄抒伟

摘 要 **目的** 研究自噬在晚期糖基化产物 (AGEs) 诱导的平滑肌细胞增殖和迁移中的具体作用。**方法** 用 AGEs 处理血管平滑肌细胞后, Western blot 法观察自噬相关蛋白 LC3-II 和 SQSTM1/p62 的表达变化; MTT 实验检测细胞增殖水平; 细胞小室实验测定细胞迁移的能力。**结果** AGEs 刺激血管平滑肌细胞后, 自噬相关蛋白 LC3-II 表达增加, SQSTM1/p62 表达减少。与对照组相比, AGEs (100 μg/ml) 处理组显著增强血管平滑肌细胞的增殖和迁移能力。但是, 使用自噬抑制剂 3-MA 预处理血管平滑肌细胞可减弱这种现象。**结论** 本研究证实 AGEs 诱导的自噬可增强 AGEs 诱导的血管平滑肌细胞的增殖和迁移能力。

关键词 晚期糖基化产物 自噬 血管平滑肌细胞 增殖 迁移

中图分类号 R363.2+1

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.01.026

Role of Autophagy in Advanced Glycation End Product-induced Proliferation and Migration in Rat Vascular Smooth Muscle Cells. Hu Pengfei, Zhou Hui, Lu Ming, *et al.* Department of Cardiology, Xinhua Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang 310005, China

Abstract Objective To identify the role of autophagy in advanced glycation end product-induced proliferation and migration in rat vascular smooth muscle cells. **Methods** After cultured rat vascular smooth muscle cells (VSMCs) were treated with advanced glycation end products (AGEs), autophagy-associated protein LC3-I/II and SQSTM1/p62 was detected by Western blot. The cell proliferation was quantified using the MTT assay. The cell migration was evaluated by Transwell migration assay. **Results** After cultured VSMCs were treated with AGEs. The level of LC3-II was up-regulated whereas SQSTM1/p62 was decreased. AGEs (100 μg/ml) increased the proliferation and migration potential significantly as compared to the control group in VSMCs. However, pretreating cells with 3-MA, an autophagy inhibitor, could attenuate these effects. **Conclusion** Our study demonstrated that AGE-induced autophagy accelerated AGE-stimulated proliferation and migration in vascular smooth muscle cells.

Key words Advanced glycation end products; Autophagy; Vascular smooth muscle cells; Proliferation; Migration

晚期糖基化产物 (advanced glycation end products, AGEs) 是指体内的还原糖通过与蛋白质、脂质

或核酸的非酶促反应形成的可影响酶的活性, 阻碍有害物质的清除和削弱受体识别的产物^[1]。AGEs 能够在糖尿病患者血管壁沉积, 促进细胞凋亡并增加其促凝活性, 从而启动并加速动脉粥样硬化的形成^[2]。自噬 (autophagy) 是细胞内受损细胞器或代谢产物的降解过程^[3]。细胞自噬水平升高时, 自噬相关蛋白

基金项目: 浙江省教育厅基金资助项目 (Y201225030)

作者单位: 310005 杭州, 浙江省新华医院心内科

通讯作者: 黄抒伟, 主任医师, 电子信箱: 1253555421@qq.com