

PI3K-Akt 信号通路在胰岛素生长因子-1 诱导平滑肌细胞中的作用

郝鹏 黄建 赖轶权 尤文俊

【摘要】 目的 比较胰岛素生长因子-1(IGF-1)对人脐静脉平滑肌细胞(HUVSMC)和脐动脉平滑肌细胞(HUASMC)增殖的影响并探讨其机制。**方法** 采用人源 HUVSMC 和 HUASMC 进行研究,噻唑蓝(MTT)法检测 IGF-1 对两种细胞增殖的影响,并通过 Western blot 技术检测 IGF-1 对两种细胞中 PI3K-Akt 信号通路的影响。**结果** 不同浓度的 IGF-1 对 HUVSMC 和 HUASMC 的增殖都有明显的促进作用,但对 HUVSMC 的促增殖作用明显高于 HUASMC。进一步检测 PI3K-Akt 信号通路,IGF-1 可激活 PI3K-Akt 信号通路,并且 IGF-1 对 HUVSMC 的激活明显强于 HUASMC。wortmannin(渥曼青霉素)明显抑制 IGF-1 对细胞增殖的促进作用。**结论** IGF-1 可明显促进平滑肌细胞增殖,并且在 HUVSMC 更为明显;IGF-1 主要通过激活 PI3K-Akt 信号通路来促进平滑肌细胞的增殖。冠状动脉搭桥术(CABG)后静脉移植物比动脉移植物更容易发生内膜增生的原因可能就在于此。

【关键词】 胰岛素样生长因子 I; 脐静脉; 脐动脉; 肌细胞,平滑肌; 内膜增生; PI3K-Akt

The effect of PI3K-Akt pathway in IGF-1 inducing proliferation of smooth muscle cell QIE Peng, HUANG Jian, LAI Yi-quan, YOU Wen-jun. Department of Cardiovascular Surgery, The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361000, China

Corresponding author: YOU Wen-jun, Email: ywj4559@sina.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inducing proliferation of human umbilical vein smooth muscle cell (HUVSMC) and human umbilical artery smooth muscle cell (HUASMC) and its mechanism. **Methods** HUVSMC and HUASMC were cultured. Cell proliferation was measured using MTT and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt (protein kinase B) signal path was measured by Western blot analysis. **Results** Different concentrations of IGF-1 can stimulate proliferation of HUVSMC and HUASMC but this proliferation was higher in HUVSMC than HUASMC. An upregulation of PI3K-Akt was observed in the HUVSMC in response to IGF-1 stimulation with lower effect in HUASMC. This effect was inhibited by wortmannin. **Conclusions** IGF-1 can promote the proliferation of SMC and this effect is greater in HUVSMC than HUASMC; the activation of IGF-1 on the proliferation of SMC is mainly through PI3K-Akt. This may explain the greater propensity of the vein conduits than the artery to undergo intimal hyperplasia following CABG (coronary artery bypass grafting).

【Key words】 Insulin-like growth factor I; Umbilical veins; Umbilical arteries; Myocytes, smooth muscle; Intimal hyperplasia; PI3K-Akt

冠状动脉旁路移植术(CABG)术后血管再狭窄是影响搭桥术远期效果的主要原因。CABG 术后一年,高达 20% 的静脉移植物闭塞,随后闭塞率为每年 4%,10 年后只剩余 50% 静脉移植物通畅,而 CABG 术后 10 年 80% 的动脉移植物仍保持通畅^[1]。很多因素可以影响静脉移植物远期通畅率,其确切机制仍存在很大争议。血管平滑肌细胞的增殖和迁移在静脉移植物再狭窄发生中起了重要作用,因此成为探索热点^[2-3]。磷脂 3 激

酶(PI3K)-Akt/蛋白激酶 B(PKB)是细胞内重要的信号通路,影响细胞生长、分化和迁移^[4]。本实验用胰岛素生长因子-1(IGF-1)介导 HUVSMC 和 HUASMC 细胞 PI3K-Akt 信号途径活化,探讨 IGF-1/PI3K/Akt 信号通路在内膜增生中的潜在机制。

材料和方法

1. 材料:HUVSMC 和 HUASMC 购自美国 ATCC;胎牛血清、DMEM 购自 Gibco;IGF-1 购自 peprotech;MTT、wortmannin 购自 Sigma;细胞裂解液(proteoJET Mammalian Cell Lysis Reagent)购自 Fermentas;IGF-1R 抗体、PI3K 及磷酸化抗体、Akt 及磷酸化抗体、 β -actin 抗体、

二抗购自 cell signal technology。

2. HUVSMC 和 HUASMC 细胞培养: 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM, 在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养。细胞聚集到皿底的 80% ~ 90% 时, 按 1:3 的比例传代, 实验使用 3 ~ 6 代细胞。

3. 分组: 剂量效应组: 20 ng/ml IGF-1, 50 ng/ml IGF-1, 100 ng/ml IGF-1, 200 ng/ml IGF-1。时间效应组: 分别为加入 IGF-1 (100 ng/ml) 后 0.5 h, 2 h, 4 h, 12 h, 24 h。

4. 细胞计数: 将 HUVSMC 和 HUASMC 以 5×10^4 细胞/孔接种于 24 孔板中, 10% FBS 的 DMEM 孵育 24 h, 饥饿处理(无血清 DMEM 孵育) 24 h。按分组加入不同终浓度的 IGF-1, 作用 24 h。用 0.1% 胰蛋白酶消化细胞, 在倒置显微镜下用细胞计数板计数。实验一式三份, 重复三次。

5. MTT: 将 HUVSMC 和 HUASMC 以 5×10^3 细胞/孔接种于 96 孔板中, 适当处理一定时间后, 并加入不同浓度的 IGF-1, 继续培养 12 h, 预先设有空白对照组及抑制剂(wortmannin)组。取出 96 孔培养板, 每孔加入 10 μ l MTT (5 mg/ml), 37 °C 继续孵育 4 h 后, 每孔加入 100 μ l 二甲基亚砜(DMSO), 振荡 10 min, 在酶标仪上测定各孔光吸收值(570 nm)。实验一式三份, 重复三次。

6. Western blot: IGF-1 通过与细胞表面受体 IGF-1R 结合, 激活细胞内影响细胞生长和增殖的有关信号通路。我们通过 Western blot 技术测定两种平滑肌细胞中 IGF-1R 的表达及 PI3K-Akt 信号通路的激活。经过适当的处理和一定的时间后, 两种细胞用冰冷的 PBS 洗和胰酶消化, 细胞悬液及上清液离心(300 \times g) 5 min。添加 100 μ l 冰冷的细胞裂解液来裂解细胞。该裂解物在 4 °C 下离心(14 000 \times g) 10 min, 收集上清(蛋白裂解物)保存于 -70 °C。BCA 试剂盒法测定该裂解物蛋白浓度。凝胶电泳分离蛋白, 并在电转液中将蛋白转移至 PVDF 膜, 相应的抗体孵育 PVDF 膜。最后显色, 扫描胶片, 蛋白带显色密度用 Scion Image 软件分析。实验重复五次。

7. 数据统计: 所有数据用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析, 组间进行 *t* 检验, 结果用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 表示有统计学差异。

结 果

1. IGF-1 对 HUVSMC 和 HUASMC 增殖的影响(表 1): 通过细胞计数提示低浓度的 IGF-1 对 SMC 即有促增殖作用, 随着其浓度的增高, IGF-1 对 SMC 的促增殖作用也增强, 但是到达一定的浓度(100 ng/ml)后作用

不再增强。IGF-1 促进细胞增殖方面的作用在 HUVSMC 表现更明显, 而 HUASMC 则较弱。

表 1 不同浓度的 IGF-1 作用于 HUVSMC 和 HUASMC 24 h 细胞计数($\times 10^7/L, \bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	HUVSMC 计数	HUASMC 计数
对照组	2.43 \pm 0.13	2.29 \pm 0.21
20 ng/ml IGF-1	2.67 \pm 0.06	2.41 \pm 0.19
50 ng/ml IGF-1	3.58 \pm 0.27	3.10 \pm 0.32
100 ng/ml IGF-1	4.12 \pm 0.31	3.87 \pm 0.29
200 ng/ml IGF-1	4.27 \pm 0.11	3.92 \pm 0.24

注: HUVSMC: 与对照组比较, 不同浓度的 IGF-1 对 HUVSMC 有促进增殖的作用, $P < 0.01$ 。HUASMC: 与对照组比较, 不同浓度的 IGF-1 对 HUASMC 有促进增殖作用($P < 0.01$), 但程度弱于 HUVSMC($P < 0.01$)

进一步实验 MTT 提示不同浓度的 IGF-1 均可明显促进 SMC 增殖(与对照组相比, $P < 0.01$), 呈一定范围内的剂量依赖关系。并且 IGF-1 的促进作用在 HUVSMC 更显著($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 不同浓度的 IGF-1 作用于 HUVSMC 和 HUASMC 24 h MTT 实验($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	HUVSMC 吸光度	HUASMC 吸光度
对照组	0.352 \pm 0.01	0.332 \pm 0.02
20 ng/ml IGF-1	0.453 \pm 0.02	0.423 \pm 0.01
50 ng/ml IGF-1	0.475 \pm 0.02	0.481 \pm 0.02
100 ng/ml IGF-1	0.693 \pm 0.01	0.538 \pm 0.01
200 ng/ml IGF-1	0.697 \pm 0.01	0.556 \pm 0.01

2. PI3K-Akt 信号通路检测: 如图 1 所示: HUVSMC 细胞中, IGF-1 诱导后 IGF-1R 的表达水平随着时间的增加而增加, 12 及 24 h 最明显, 而 HUASMC 仅在 4 h 有一定程度的增加, 并且这种刺激效应不能持续。

进一步检测 PI3K-Akt, 如图 2, 3 所示: HUVSMC 中, IGF-1 诱导 p-PI3K、p-Akt 表达, 12 h 达到最大程度, 甚至持续到 24 h。而在 HUASMC, IGF-1 的诱导作用在 2 h 比较明显, 并且这种作用不能持续, p-PI3K、p-Akt 在 12 h 的时候下降到正常水平甚至更低。IGF-1 诱导平滑肌细胞 PI3K 磷酸化, 也存在一种剂量依赖效应(图 4)。HUVSMC 的明显效应在一个低剂量时就开始了, 比 HUASMC 更敏感。

3. wortmannin 对 IGF-1 诱导的平滑肌增生的作用: 特异性的 PI3K 抑制剂 wortmannin 抑制 PI3K 的活性。如图 5 所示, wortmannin (20 μ mol/L) 预处理 HUVSMC 和 HUASMC 后, 抑制了 IGF-1 的促增殖作用。

讨 论

IGF-1 参与蛋白合成、细胞迁移和有丝分裂, 是血

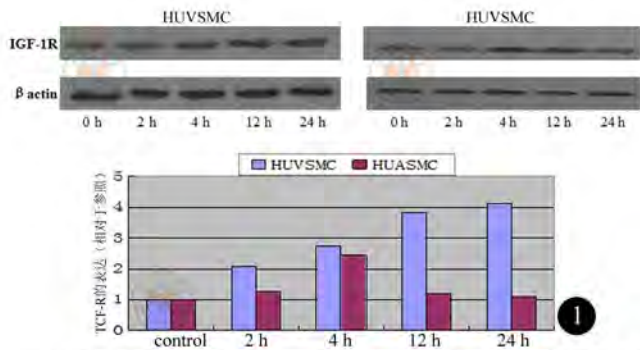


图1 两种细胞中IGF-1对IGF-1R表达的影响。培养的平滑肌细胞用IGF-1 (100 ng/ml) 各处理2 h、4 h、12 h、24 h。柱状图表示的是IGF-1R/β-actin

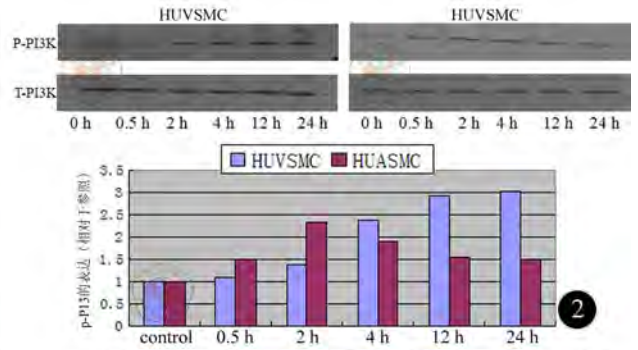


图2 在两种细胞中, IGF-1对PI3K磷酸化表达的影响, IGF-1 (100 ng/ml) 作用于两种平滑肌细胞各0.5 h、2 h、4 h、12 h、24 h。柱状图表示的是p-PI3K/PI3K (p-PI3K: 磷酸化PI3K; T-PI3K: 总的PI3K)

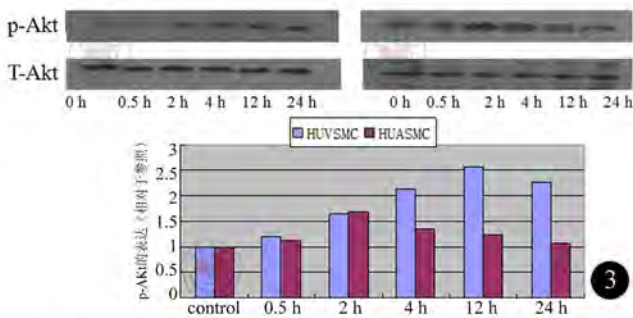


图3 在两种细胞中, IGF-1对Akt磷酸化表达的影响, IGF-1 (100 ng/ml) 作用于两种平滑肌细胞各0.5 h、2 h、4 h、12 h、24 h。柱状图表示的是p-Akt/Akt

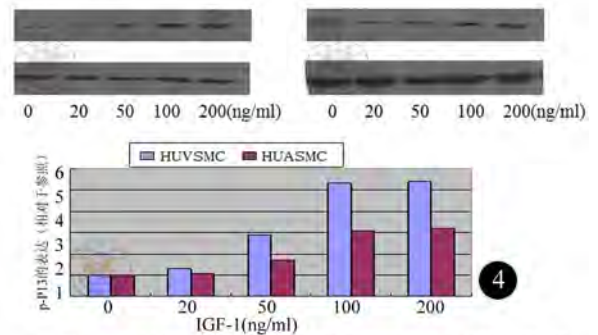


图4 两种细胞中, IGF-1影响磷酸化PI3K的剂量效应。图示为IGF-1作用细胞4 h的时候, IGF-1诱导PI3K磷酸化有剂量依赖关系。柱状图表示的是p-PI3K/PI3K

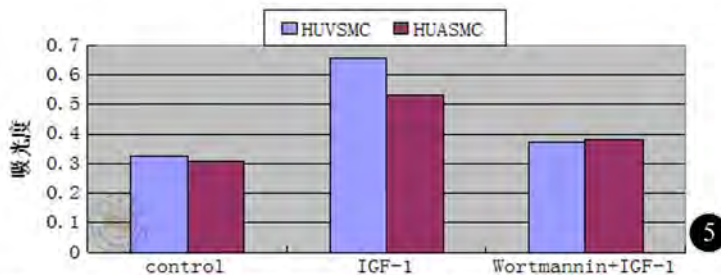


图5 MTT酶标仪检测, wortmannin (PI3K抑制剂) 对于IGF-1诱导HUVMSC和HUASMC细胞增生的阻滞作用。先加入wortmannin (20 μmol/L) 预处理2 h, 然后加入IGF-1 (100 ng/ml) 刺激24 h

管平滑肌细胞、成纤维细胞和巨噬细胞的存活因子^[5]。激活 IGF-1 受体会触发多种信号通路, 这些通路可诱导平滑肌细胞的生长、分化和迁移^[5-6]。新生内膜细胞由于 IGF-1R 的高表达, 对环境的改变会更敏感^[7]。在本实验发现 IGF-1 介导的 IGF-1R 上调在 HUVMSC 要比 HUASMC 明显。

PI3K-Akt 通路对 SMC 增殖非常重要, 是导致内膜增生和移植物衰败的关键因素^[8]。另有研究证明静脉平滑肌细胞中, 随着时间变化 p-PI3K 递增, 在 4 h 增加, 并持续 24 h, 但是动脉平滑肌细胞确没有此效应^[9]。本实验发现 IGF-1 刺激后, HUVMSC 中 IGF-1R、p-PI3K、p-Akt 在数量和时间上显著增加, 而 HUASMC

则较弱, 这可能揭示搭桥术后静脉移植物内膜增生的潜在机制。

随传代次数增加细胞表型会发生明显变化^[10-11], 因此本实验采用的是 3~6 代平滑肌细胞。静脉和动脉平滑肌细胞血管组织学及生化组成上的差异可能是静脉移植物内膜增生的原因^[12]。搭桥术后, 剪切力是激活平滑肌细胞中 Akt 磷酸化的始动因素, 是触发内膜增生的一个途径^[13]。本实验中 PI3K 抑制剂 wortmannin 抑制了 IGF-1 介导的增殖效应, 这表明 IGF-1 通过 PI3K-Akt 信号通路导致平滑肌细胞增生, 并最终导致血管狭窄。

静脉移植物衰败是一种常见的临床问题, 许多生

长因子和细胞因子参与了增生信号的传导,最终导致平滑肌细胞增殖。本研究提示:与动脉相比,静脉平滑肌细胞中激活的 IGF-1R、p-PI3K、p-Akt 的量更多,时间更长。因此阐明 PI3K-Akt 信号通路的表达及其对动脉和静脉移植物的作用,将可能在有效治疗静脉移植物相关疾病方面提供新的方法。

参 考 文 献

- [1] Turner NA, Ho S, Warburton P, et al. Smooth muscle cells cultured from human saphenous vein exhibit increased proliferation, invasion, and mitogen-activated protein kinase activation in vitro compared with paired internal mammary artery cells. *J Vasc Surg*, 2007, 45: 1022-1028.
- [2] Cheng J, Du J. Mechanical stretch simulates proliferation of venous smooth muscle cells through activation of the insulin-like growth factor-1 receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27: 1744-1751.
- [3] Mitra AK, Jia G, Gangahar DM, et al. Temporal PTEN inactivation causes proliferation of saphenous vein smooth muscle cells of human CABG conduits. *J Cell Mol Med*, 2009, 13: 177-187.
- [4] Campbell M, Trimble ER. Modification of PI3K-and MAPK-dependent chemotaxis in aortic vascular smooth muscle cells by protein kinase CbetaII. *Circ Res*, 2005, 96: 197-206.
- [5] Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, et al. Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell*, 2004, 5: 221-230.
- [6] Maile LA, Clemmons DR. Integrin-associated protein binding domain of thrombospondin-1 enhances insulin-like growth factor-1 receptor signaling in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 2003, 93: 925-931.
- [7] Myit S, Delafontaine P, Bochaton-Piallat ML, et al. Different growth properties of neointimal and medial smooth muscle cells in response to growth factors. *J Vasc Res*, 2003, 40: 97-104.
- [8] Irfan I, Galaria MD, Suzanne M, et al. Urokinase-Induced Smooth Muscle Cell Migration Requires PI3-K and Akt Activation. *J Surg Res*, 2005, 127: 46-52.
- [9] Jia G, Mitra AK, Gangahar DM, et al. Insulin-like growth factor-1 induces phosphorylation of PI3K-Akt/PKB to potentiate proliferation of smooth muscle cells in human saphenous vein. *Exp Mol Pathol*, 2010, 89: 20-26.
- [10] Deng DX, Spin JM, Tsalenko A, et al. Molecular signatures determining coronary artery and saphenous vein smooth muscle cell phenotypes: distinct responses to stimuli. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol*, 2006, 26: 1058-1065.
- [11] Chadjichristos CE, Morel S, Derouette JP, et al. Targeting connexin 43 prevents platelet-derived growth factor-BB-induced phenotypic change in porcine coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res*, 2008, 102: 653-660.
- [12] Muto A, Model L, Ziegler K, et al. Mechanisms of Vein Graft Adaptation to the Arterial Circulation-Insights Into the Neointimal Algorithm and Management Strategies. *Circ J*, 2010, 74: 1501-1512.
- [13] Sedding DG, Hermesen J, Seay U, et al. Caveolin-1 facilitates mechanosensitive protein kinase B (Akt) signaling in vitro and in vivo. *Circ Res*, 2005, 96: 635-642.

(收稿日期:2011-12-28)

(本文编辑:戚红丹)

郑鹏,黄建,赖轶权,等. PI3K-Akt 信号通路在胰岛素生长因子-1 诱导平滑肌细胞中的作用[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2012,6(15):4207-4210.

中 华 临 床 医 生 杂 志