

# 白细胞介素 10 抑制大鼠血管平滑肌细胞增殖的信号途径

夏春芳, 霍 勇, 尹 航, 朱国英, 庞永正, 唐朝枢

(北京大学第一医院心内科, 北京 100034)

[关键词] 白细胞介素 10; 细胞增殖; 信号途径; 肌, 平滑, 血管

[摘要] 为探讨白细胞介素 10 抑制血管紧张素 $\text{I}^{\text{I}}$ 诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖的细胞信号机制, 采用 $^3\text{H}$ -TdR 掺入的方法检测血管平滑肌细胞 DNA 合成,  $^{32}\text{P}$ -ATP 掺入检测丝裂素活化蛋白激酶和蛋白激酶 C 活性, 蛋白免疫印迹杂交及免疫沉淀方法检测粘着斑激酶蛋白表达及其活性变化。结果显示, 白细胞介素 10 呈浓度依赖性抑制血管紧张素 $\text{I}^{\text{I}}$ 诱导的血管平滑肌细胞增殖, 同时下调血管紧张素 $\text{I}^{\text{I}}$ 引起的丝裂素活化蛋白激酶、蛋白激酶 C 和粘着斑激酶信号的激活( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。因此白细胞介素 10 可能通过下调血管紧张素 $\text{I}^{\text{I}}$ 刺激的丝裂素活化蛋白激酶、蛋白激酶 C 和粘着斑激酶等增殖相关信号的激活而抑制其刺激的血管平滑肌细胞增殖。

[中图分类号] Q513

[文献标识码] A

## The Signal Pathway Involved in Interleukin 10 Inhibiting the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells

XIA Chun- Fang, HUO Yong, YIN Hang, ZHU Guo- Ying, PANG Yong- Zheng, and TANG Chao- Shu

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

MeSH Interleukin 10; Proliferation; Signal Pathway; Muscle, Smooth, Vascular

**ABSTRACT** **Aim** To investigate the possible signal transduction pathway by which IL-10 inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) induced by angiotensin $\text{I}^{\text{I}}$  (Ang $\text{I}^{\text{I}}$ ). **Methods**  $^3\text{H}$ -TdR and  $^{32}\text{P}$ -ATP incorporation were used to detect the proliferation of VSMC and the activity of mitogen activity protein kinase (MAPK) and protein kinase C (PKC), respectively. Western blot and immunoprecipitation were applied to assay the expression and activity of focal adhesion kinase (FAK), respectively. **Results** IL-10 inhibited VSMC proliferation induced by Ang $\text{I}^{\text{I}}$  and down regulated Ang $\text{I}^{\text{I}}$  induced activation of MAPK, PKC and FAK ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusions**

The results suggest that the inhibiting effect of IL-10 on Ang $\text{I}^{\text{I}}$  stimulated VSMC proliferation may be mediated by down regulating MAPK, PKC and FAK activity stimulated by Ang $\text{I}^{\text{I}}$ .

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖和炎症反应是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As)、血管成形术后狭窄 (restenosis, RS) 等血管损伤性疾病的重要病理特征<sup>[1~3]</sup>。白细胞介素 10 (interleukin 10, IL-10) 是一种多功能细胞因子, 具有抑制炎症反应, 抑制细胞因子、生长因子等生物活性因子生成的效应<sup>[4]</sup>。近来在培养的人 VSMC 上观察到 IL-10 抑制碱性成纤维细胞生长因子及肿瘤坏死因子 $\alpha$  等诱导的 VSMC 增殖<sup>[5, 6]</sup>, 我们曾报道 IL-10 可明显抑制血管紧张素 $\text{I}^{\text{I}}$  (angiotensin $\text{I}^{\text{I}}$ , Ang $\text{I}^{\text{I}}$ ) 及尾加压素 $\text{I}$  (urotensin $\text{I}$ , U $\text{I}$ ) 等丝裂原的促 VSMC 增殖作用<sup>[7]</sup>。IL-10 抑制 VSMC 增殖的机制尚未完全阐明, 本实验对 IL-10 抑制 VSMC 增殖的可能细胞信

号转导机制进行了探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

白细胞介素 10 购自 Strathmann 公司, Ang $\text{I}^{\text{I}}$  购自 Sigma 公司, 抗 FAK 多抗及 PY99 抗体购自 Santa Cruz 公司, 二抗购自中山生物公司,  $^3\text{H}$ -TdR 及  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP 购自北京原子能研究所, 亮抑酶肽、蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 底物肽、PKA 抑制剂为 Sigma 公司产品, 其余试剂为国产分析纯。

### 1.2 大鼠主动脉平滑肌细胞培养

采用贴块法。Wistar 大鼠 (150~180 g) 麻醉后, 无菌摘取胸主动脉, Hanks 液洗涤 3 遍, 纵行剖开, 剥离出中膜, 在含 20% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中剪碎, 均匀平铺于培养瓶底, 37 $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  条件下

培养及传代。经形态学及  $\alpha$ -actin 免疫组化染色显示确定为平滑肌细胞, 实验用第 2~6 代细胞。

### 1.3 $^3\text{H}$ -TdR 掺入实验<sup>[8]</sup>

将汇合的血管平滑肌细胞经 0.125% 胰酶消化后以  $5 \times 10^7$  个细胞/L 浓度接种于 24 孔板上。贴壁 24 h 后换无血清 RPMI 1640 培养液培养 24 h, 使细胞统一至 G0 期, 按如下分组加入刺激因素培养 12 h ( $n=12$ ): 对照组继续培养, 不加干预因素; ④IL-10 组加入  $10^{-5}$  g/L IL-10; ④Ang  $\text{Ⓢ}$  组含  $10^{-7}$  mol/L Ang  $\text{Ⓢ}$ ; Ang  $\text{Ⓢ}$ + IL-10 组含  $10^{-7}$  mol/L Ang  $\text{Ⓢ}$  并加入  $10^{-8} \sim 10^{-5}$  g/L 不同浓度的 IL-10。先给予 IL-10, 20 min 后加入 Ang  $\text{Ⓢ}$  再孵育 20 min, 收集每组中 6 孔细胞, 进行丝裂素活化蛋白激酶 (mitogen activity protein kinase, MAPK) 及 PKC 活性测定。其余继续培养 12 h 后加入  $3.7 \times 10^7$  Bq/L 的  $^3\text{H}$ -TdR, 继续孵育 12 h, 终止反应。经微孔滤膜收集细胞, 冲洗并烘干滤膜后, 在  $\beta$  液闪计数器上测定  $^3\text{H}$  放射活性 (cpm)。

VSMC 台盼蓝染色, 镜下计数, 非染色细胞与总细胞数的比值为细胞活力, 并取细胞培养上清, 用一步法测定乳酸脱氢酶 (LDH) 活性。

### 1.4 免疫印迹杂交 (Western Blot)<sup>[9]</sup>

将培养的 VSMC 经胰酶消化后以  $3 \times 10^8$  个细胞/L 浓度接种于 6 孔板上。贴壁 24 h 后换无血清 RPMI 1640 培养液培养 24 h, 使细胞统一至 G0 期, 每 3 孔合为一个样本, 分组同  $^3\text{H}$ -TdR 掺入实验 ( $n=3$ ), 给予 IL-10 20 min 后, 加入 Ang  $\text{Ⓢ}$  反应 20 min, 弃培养液,  $4^\circ\text{C}$  预冷的 PBS 洗涤 2 次, 加入 1 mL 预冷 RIPA 裂解缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 1% NP-40, 1% 脱氧胆酸钠, 1% SDS, 1% aprotinin, 50 mmol/L NaF, 0.1 mmol/L  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) 裂解细胞,  $4^\circ\text{C}$  12 000 g 离心 10 min, 吸取上清, Lowry 法测定蛋白浓度, 分装备用。按文献[8]的方法进行免疫印迹杂交: 取样本进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜, 封闭, 1:1 000 稀释的抗 FAK 多抗杂交, 1:2 000 稀释的二抗-辣根过氧化物酶 (HRP) 交联物反应 2 h, 增强化学发光试剂进行显色, 计算机灰度扫描处理。

### 1.5 免疫沉淀<sup>[9]</sup>

用于检测 FAK 磷酸化的蛋白表达量。另取 100  $\mu\text{g}$  细胞裂解蛋白, 加入 10  $\mu\text{g}$  PY99 抗体,  $4^\circ\text{C}$  反应 1 h, 后加入 50  $\mu\text{L}$  A 蛋白-琼脂糖凝胶珠进行沉淀, 裂解缓冲液洗 3 次, 加上样缓冲液,  $100^\circ\text{C}$  加热 3 min, 进行 Western blot 分析。

### 1.6 MAPK 及 PKC 活性测定

将 VSMC 用冷 PBS 液洗涤三次, 每孔加入 0.3

mL 细胞裂解液 (mmol/L: 50 HEPES, 150 NaCl, 10  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 100 NaF, 1 PMSF, 2 DTT, 0.01 抑肽酶, 0.02 亮抑酶肽, 1% Triton-X-100, 2  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), 冰上孵育 30 min, 超声破碎,  $4^\circ\text{C}$  13 000g 离心 10 min, 取上清备用。

丝裂素活化蛋白激酶活性测定<sup>[10]</sup>: 取上清 0.15 mL, 加入 50  $\mu\text{L}$  激酶缓冲液 (mmol/L: 20 HEPES, 10  $\text{MgCl}_2$ , 2  $\text{MnCl}_2$ , 2 DTT, 0.5  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 EGTA, 0.1 g/L BSA, 2 亮抑酶肽, 0.05 ATP- $\text{Na}_2$ , 0.05 PKA 抑制剂, 1 g/L MBP, 37 Bq/L  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP) 混匀,  $30^\circ\text{C}$  反应 15 min, 取 80  $\mu\text{L}$  反应液点于 P81 磷酸纤维素滤纸上, 干燥后 0.5% 磷酸液冲洗 5 次, 加闪烁液, 于  $\beta$  液闪仪上测定  $^{32}\text{P}$  放射活性, 同时作不加样本的空白对照。以实验管和空白管  $^{32}\text{P}$  掺入量的差值表示 MAPK 活性。

蛋白激酶 C 活性测定<sup>[10]</sup>: 取已裂解样本 100  $\mu\text{L}$ , 悬浮于 50  $\mu\text{L}$  激酶缓冲液中 (mmol/L: 20 HEPES, 10  $\text{MgCl}_2$ , 2  $\text{MnCl}_2$ , 2 DTT, 0.1 g/L BSA, 2 亮抑酶肽, 0.05 ATP, 1.25  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 g/L PS, 1 g/L PKC 底物肽, 37 Bq/L  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP), 混匀, 余步骤同 MAPK 测定。

### 1.7 统计学分析

实验数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。两组间的差异应用  $t$  检验, 多组间比较采用方差分析和组间  $q$  检验作统计学处理。  $P < 0.05$  为差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 白细胞介素 10 对血管紧张素 $\text{Ⓢ}$ 刺激的血管平滑肌细胞增殖的影响

从图 1 (Figure 1) 可见, 单纯白细胞介素 10 ( $10^{-5}$  g/L) 对细胞  $^3\text{H}$ -TdR 掺入并无明显影响 (与对照组比较  $P > 0.05$ )。  $10^{-7}$  mol/L Ang  $\text{Ⓢ}$  孵育的 VSMC,  $^3\text{H}$ -TdR 掺入较对照组高 44% ( $P < 0.05$ )。白细胞介素 10 ( $10^{-7} \sim 10^{-5}$  g/L) 呈显著抑制 Ang  $\text{Ⓢ}$  刺激的  $^3\text{H}$ -TdR 掺入, 较单纯 Ang  $\text{Ⓢ}$  组低 31% ~ 37% ( $P < 0.05$ )。低浓度 IL-10 对 Ang  $\text{Ⓢ}$  效应的抑制作用无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

$10^{-5}$  g/L 白细胞介素 10 对细胞 LDH 漏出和染料排斥实验的影响与对照组相近 (LDH:  $59.1 \pm 8.7$  比  $62.6 \pm 10.3$  IU/L,  $P > 0.05$ ; 染料排斥实验中非染色细胞数/总细胞数  $97.2 \pm 7.3\%$  比  $95.6 \pm 6.7\%$ ,  $P > 0.05$ )。

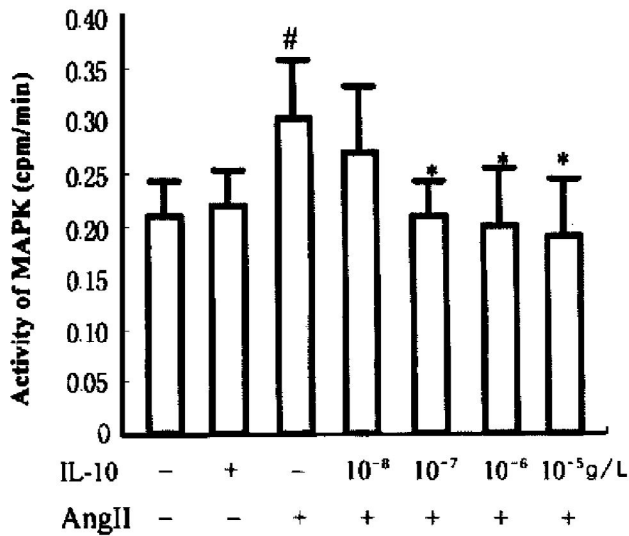


图 1. 白细胞介素 10 对血管紧张素 Ⅱ 诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Figure 1. The effect of IL-10 on Ang Ⅱ induced cultured rat VSMC proliferation. # :  $P < 0.05$ , compared with control (- / -); \* :  $P < 0.05$ , compared with Ang Ⅱ group (- / +)

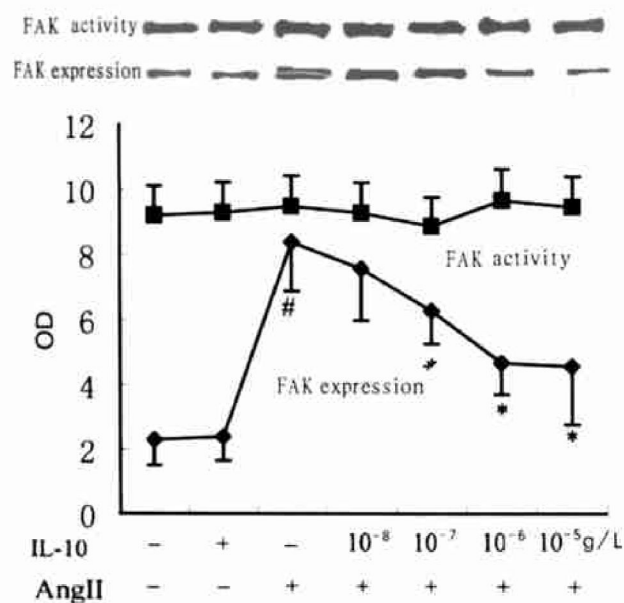


图 2. 白细胞介素 10 对 Ang Ⅱ 刺激的 FAK 的表达及活力上调的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Figure 2. The effect of IL-10 on Ang Ⅱ stimulated FAK expression and activity in rat VSMC. # :  $P < 0.01$ , compared with control(- / -), \* :  $P < 0.05$ , compared with ANG Ⅱ group

### 2.2 白细胞介素 10 对 FAK 活性的影响

从图 2(Figure 2) 可见, 单纯 IL-10( $10^{-5}$  g/L) 组与对照组比较 FAK 活性的差异无显著性。 $10^{-7}$  mol/L Ang Ⅱ 刺激细胞 30 min 后, FAK 活性较对照组增加 1.3 倍( $P < 0.01$ ), IL-10( $10^{-7} \sim 10^{-5}$  g/L) 显著抑制 Ang Ⅱ 刺激的 FAK 激活, 较单纯 Ang Ⅱ 组低 18% ~ 52% ( $P < 0.05$ ), 低浓度 IL-10( $10^{-8}$  g/L) 对 Ang Ⅱ

激活 FAK 无明显抑制作用( $P > 0.05$ )。本实验 Ang Ⅱ 孵育 30 min 后, VSMC 的 FAK 活性增加, 不是由于 FAK 蛋白表达增加所致, 各组间 FAK 蛋白的表达相近, 差异无显著性( $P < 0.05$ )。

### 2.3 白细胞介素 10 对 MAPK 及蛋白激酶 C 激活的影响

Ang Ⅱ( $10^{-7}$  mol/L) 刺激 MAPK 和 PKC 活性分别增高 22% ( $P < 0.01$ ) 和 244% ( $P < 0.01$ ),  $10^{-7} \sim 10^{-5}$  g/L IL-10 明显减弱 Ang Ⅱ 的这一作用( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。单纯 IL-10( $10^{-5}$  g/L) 可上调 PKC 活性达 150% ( $P < 0.05$ ), 但对 MAPK 活性无明显影响( $P > 0.05$ ) (图 3, Figure 3)。

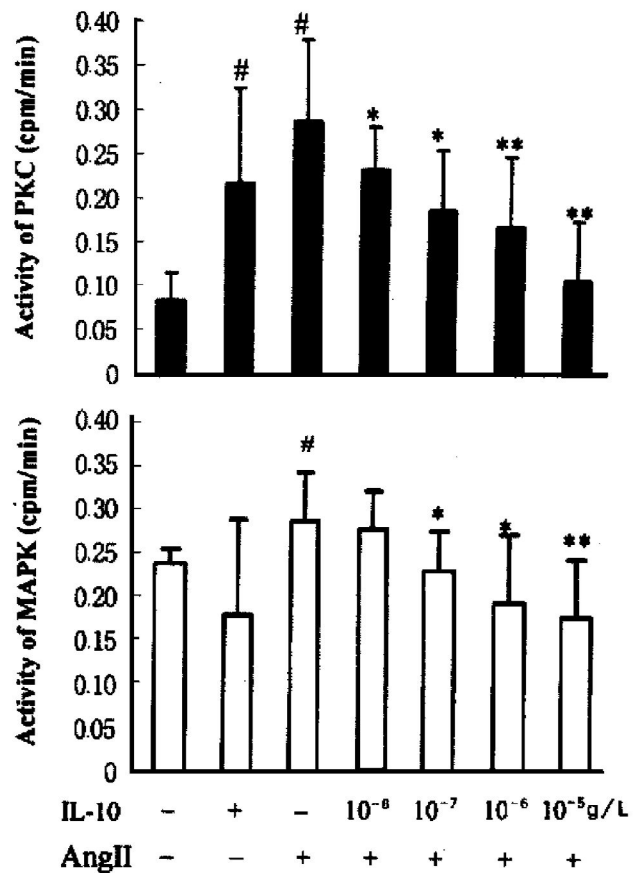


图 3. 白细胞介素 10 对 Ang Ⅱ 刺激的 MAPK、PKC 的活性的影响

Figure 3. The effects of IL-10 on the activity of MAPK and PKC induced by Ang Ⅱ in cultured VSMC ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ ). # :  $P < 0.01$ , compared with control group, \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ , compared with Ang Ⅱ group

### 3 讨论

动脉粥样硬化及再狭窄的发生中 VSMC 增殖与多种血管活性肽及细胞因子的介导密切相关<sup>[11]</sup>, 其中血管局部的肾素-血管紧张素系统的作用尤为突

出,如在血管成形术后3天,血管紧张素和血管紧张素转换酶基因表达即开始增加,动物实验发现血管球囊损伤后AngⅡ受体AT1在新生内膜中表达升高4倍<sup>[12]</sup>。AngⅡ刺激VSMC增殖,促进血管再狭窄的发生。最近文献<sup>[13]</sup>报道,在As斑块中IL-10出现表达,动物实验显示外源性给予IL-10可减轻家兔As斑块损伤<sup>[14]</sup>以及球囊拉伤或支架置入导致的管腔狭窄<sup>[15]</sup>。我们也曾报告正常血管无IL-10的明显表达,而在球囊损伤后的大鼠主动脉中则出现高表达<sup>[16]</sup>,表明IL-10具有潜在的抗As及再狭窄作用。

本工作在培养的大鼠VSMC上,<sup>3</sup>H-TdR作为DNA合成标志,在AngⅡ刺激下VSMC<sup>3</sup>H-TdR掺入增加,与文献报道一致。IL-10( $10^{-7}$ ~ $10^{-5}$ g/L)显著抑制AngⅡ引起的<sup>3</sup>H-TdR掺入增加,但对VSMC的细胞活力并无影响,表明IL-10抑制VSMC增殖并非通过细胞毒性作用实现的。AngⅡ与细胞上血管紧张素Ⅰ型受体结合后,激活G蛋白,随之激活其下游多个信号通路,包括MAPK、PKC及FAK等<sup>[17~19]</sup>,从而引起细胞增殖。IL-10本身对VSMC增殖并无影响,但下调AngⅡ诱导MAPK、PKC及FAK的激活,提示IL-10可能作用于这些酶的上游,IL-10仅下调FAK活性,但对其表达无影响,更证明IL-10是通过调节FAK上游信号来调节AngⅡ的作用。高浓度IL-10可上调PKC活性,其机制尚待进一步探讨。

在再狭窄和As的发生过程中IL-10出现高表达,除拮抗炎症外,IL-10还抑制AngⅡ的促丝裂增殖作用,因此IL-10可能通过多种作用途径而在As与再狭窄中发挥保护作用。本工作探讨了IL-10拮抗丝裂原促增殖作用的可能信号途径,为IL-10成为一种新的血管重塑调节因子提供依据。

#### 参考文献

- [1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. *Nature*, 1991, **362**: 801-809
- [2] Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease [J]. *Am Heart J*, 1999, **138**(5 Pt 2): S419-20
- [3] Biasucci LM, Liuzzo G, Buffon A, et al. The variable role of inflammation in acute coronary syndromes and in restenosis [J]. *Semin Interv Cardiol*, 1999, **4**(3): 105-110
- [4] Irfan L, Kailash B, Razzaque A. Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity [J]. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 1997, **79**: 469-484

- [5] Selzman CH, McIntyre RC Jr, Shamesn BD, et al. Interleukin 10 inhibits human vascular smooth muscle proliferation [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, **30**(4): 889-896
- [6] Selzman CH, Meldrum DR, Cain BS, et al. Interleukin-10 inhibits postinjury tumor necrosis factor-mediated human vascular smooth muscle proliferation [J]. *J Surg Res*, 1998, **80**(2): 352-356
- [7] 夏春芳, 霍勇, 尹航, 等. IL-10对尾加压素Ⅱ诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响及其机制 [J]. *北京医科大学学报*, 2001, **4**: 12-15
- [8] Poter JG, Catalano R, McEnroe G, et al. C-type natriuretic peptide inhibits growth factor dependent DNA synthesis in smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol*, 1992, **263**: C1 001-006
- [9] 奥斯伯, 步伦特, 金斯顿, 等. 精编分子生物学实验指南 [M]. 北京: 中国科学出版社, 1998; 366-400
- [10] 李田昌, 庞永正, 唐朝枢. 丝裂素活化蛋白激酶活性测定 [J]. *基础医学与临床*, 1996, **16**: 155-158
- [11] Fiorani M, Cantoni O, Tasinato, et al. Hydrogen peroxide and fetal bovine serum induced DNA synthesis in vascular smooth muscle cells: positive and negative regulation by protein kinase C isoforms [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1995, **1269**: 98-104
- [12] Clinton S, Libby P. Cytokines and growth factors in atherosclerosis [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 1992, **116**: 1 292-299
- [13] Mohan V, Christer S, Alicia S, et al. Balloon angioplasty enhances the expression of angiotensinⅡAT1 Receptors in neointima of rat aorta [J]. *J Clin Invest*, 1992, **90**: 1 707-712
- [14] Mallat Z, Heymes C, Ohan J, et al. Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerosis plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19**(3): 611-616
- [15] Mallat Z, Besnard S, Duriez M, et al. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 1999, **85**(8): 17-24
- [16] Feldman LJ, Aguirre L, Ziolk M, et al. Interleukin 10 inhibits intimal hyperplasia after angioplasty or stent implantation in hypercholesterolemic rabbits [J]. *Circulation*, 2000, **101**: 908-916
- [17] Okuda M, Kawahara Y, Nakayama I, et al. AngiotensinⅡ transduces its signal to focal adhesions via angiotensinⅡ type 1 receptors in vascular smooth muscle cells [J]. *FEBS Lett*, 1995, **368**(2): 343-347
- [18] Sabri A, Govindarajan G, Griffin TM, et al. Calcium- and protein kinase C-dependent activation of the tyrosine kinase PYK2 by angiotensinⅡ in vascular smooth muscle [J]. *Circ Res*, 1998, **83**(8): 841-851
- [19] Duff JL, Marrero MB, Paxton WG, et al. AngiotensinⅡ signal transduction and the mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *Cardiovasc Res*, 1995, **30**(4): 511-517

(此文2001-02-10收到,2001-07-15修回)

(此文编辑 朱雯霞)