

# 硫化氢对大鼠基底动脉血管平滑肌细胞迁移、增殖及舒张作用的影响

陈锦花 陈志武

**摘要** 目的 探讨硫化氢( $H_2S$ )对大鼠基底动脉(BAs)平滑肌细胞(VSMC)增殖、迁移及舒张的影响及其与血管内皮细胞生长因子受体2(VEGFR<sub>2</sub>)的关系。方法 原代培养大鼠BAs VSMC。分别采用免疫荧光法鉴定BAs VSMC中VEGFR<sub>2</sub>表达,细胞划痕实验观察BAs VSMC迁移能力的改变,CCK-8法检测 $H_2S$ 对BAs VSMC增殖的影响,细胞舒张实验检测 $H_2S$ 对VSMC的舒张能力。结果 免疫荧光检测结果显示VEGFR<sub>2</sub>在BAs VSMC中表达。细胞划痕和增殖实验结果显示,与对照组比较,外源性 $H_2S$ 供体NaHS(100  $\mu$ mol/L)可提高BAs VSMC增殖、迁移能力,促进VSMC舒张( $P < 0.05$ )。与NaHS作用相似,10 ng/ml VEGF亦可增强BAs VSMC的迁移、增殖及舒张能力;而给予 $10^{-5}$  mol/L VEGFR<sub>2</sub>阻断剂SU5416预处理,可降低NaHS对细胞增殖、迁移及舒张。结论  $H_2S$ 可促进VSMC的增殖、迁移及细胞舒张,其作用可能与激动VEGFR<sub>2</sub>有关。

**关键词** 硫化氢;血管平滑肌细胞;血管内皮生长因子受体2;增殖;迁移;舒张

中图分类号 R310.4710

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)10-1510-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.10.006

硫化氢(hydrogen sulfide,  $H_2S$ )是继一氧化氮(nitric oxide, NO)和一氧化碳(carbon monoxide, CO)后发现的体内第3种气体信号分子<sup>[1]</sup>。血管内皮来源的 $H_2S$ 可通过舒张血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)调节血管张力和器官血流量<sup>[2]</sup>。血管内皮生长因子受体2(vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR<sub>2</sub>)介导了VEGF(vascular endothelial growth factor, VEGF)的大部分生物学效应,是内皮细胞中VEGF驱动反应的主要调节因子。VEGF作为促进因子,通过激活血管VEGFR<sub>2</sub>产生级联反应促进血管内皮细胞的存

活、增殖、迁移<sup>[3]</sup>。最近,有文献<sup>[4]</sup>报道 $H_2S$ 通过断裂内皮细胞靶分子VEGFR<sub>2</sub>中Cys1045-Cys1024之间新的S-S键发挥内皮细胞的增殖、迁移等作用。但是, $H_2S$ 对VSMC的迁移、增殖及舒张作用是否与VEGFR<sub>2</sub>有关,尚未见报道。因此,该实验以VEGFR<sub>2</sub>为研究对象,应用VEGFR<sub>2</sub>受体阻断剂SU5416<sup>[5]</sup>探讨 $H_2S$ 对VSMC迁移、增殖及舒张的影响,并揭示其与VEGFR<sub>2</sub>的关系,进而阐明 $H_2S$ 促进VSMC舒张作用的具体机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

**1.1.1 主要试剂** NaHS实验前用蒸馏水溶解后避光保存,购自美国Sigma公司;SU5416购自美国MCE公司;重组大鼠VEGFA/VEGF164购自无锡Novopeptide公司;alpha SMA抗体(1:200)购自常州Affinity公司;DMEM培养基购自美国Hyclone公司;胎牛血清购自美国Sigma公司;DAPI染色液购自上海碧云天生物技术研究;胰酶购自南京维森特生物技术有限公司;CCK-8试剂盒购自美国Sigma公司;其余试剂均为国产分析纯。

**1.1.2 仪器** 电子天平(FA1004)购自上海天平仪器厂;连续变倍体式显微镜(XTS-20)购自北京泰克仪器有限公司;全自动活细胞成像仪(CellDiscoverer 7.0)购自德国蔡司公司。

**1.1.3 动物** 清洁级健康SD大鼠20只,体质量180~220 g,雌雄各半,6~8周龄,由安徽医科大学实验动物中心提供[合格证号:(皖)scxk2017-001],饲养温度为(22±3)℃。动物实验均符合安徽医科大学动物伦理委员会规定。

### 1.2 方法

**1.2.1 VSMC的培养与鉴定** 取2只大鼠,麻醉后无菌状态下断头取脑,在冰的无菌PBS中,显微镜下,小心剥离基底动脉的周围组织,将基底动脉剥离干净,置于另一有冰的无菌培养基小皿中转移至超净台。将BAs转移至含少许培养液(20%的胎牛血

2020-03-28 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81374002、81973510)

作者单位:安徽医科大学药理教研室,合肥 230032

作者简介:陈锦花,女,硕士研究生;

陈志武,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:

chpharmzw@163.com

清)的0.5 ml EP管中,用眼科镊将BAs剪碎至约0.5 mm长的组织块。最后将剪碎的组织块吸出,Z字形铺于小皿中(提前包被),静置于含5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱(37℃)培养。约2 h后组织块贴壁,加入4 ml培养基,4~5 d后待细胞长出后小心换液,之后可视细胞生长情况逐步换液。消化细胞方法如下:PBS清洗2~3遍;加入含0.25% Trypsin和0.02% EDTA的胰酶细胞消化液,待细胞变圆且未飘起时(显微镜下观察)吸去胰酶,加入含20%胎牛血清的培养液终止消化,轻轻吹打细胞并移入新的培养皿中加4 ml培养液(20%胎牛血清)继续培养。之后按细胞的生长情况进行传代和鉴定。①形态学鉴定:倒置显微镜下观察细胞的生长状态、大小及排列方式。②免疫荧光鉴定:在24孔板中放入多聚赖氨酸处理的无菌盖玻片并接种VSMC悬液,2 d后进行免疫荧光鉴定。实验步骤如下:吸去原培养液,PBS洗3遍;4%的多聚甲醛固定15 min;PBS洗3遍;0.1%的Triton室温孵育10 min,3% BSA室温孵育1 h,吸去。加入单克隆抗 $\alpha$ -actin抗体(1:200)4℃孵育过夜;PBS液洗4遍(每次5 min),加入荧光二抗室温避光孵育1 h,PBS洗4遍,方法同上;DAPI核染10 min,PBS洗3遍,每次5 min;细胞爬片上滴加抗荧光淬灭封固液,置于荧光显微镜下避光观察并拍照。

**1.2.2 细胞划痕实验** 将VSMC接种至6孔板,90%以上融合后,用黄色无菌枪头在培养板单层VSMC的相同位置画直线,造成“伤口”,PBS洗去脱落细胞,分为对照组、NaHS(100  $\mu$ mol/L)组、NaHS+SU5416<sup>[5]</sup>组、VEGF(10 ng/ml)<sup>[4]</sup>组,孵育24 h,活细胞成像仪观察VSMC从划痕处向中央生长的距离,距离用于衡量细胞迁移能力,随机取5个视野(每孔)观察并拍摄,Image-J图像软件测量细胞迁移距离并计算平均值,进行3次独立实验。

**1.2.3 VSMC收缩幅度的测定** 将上述培养的VSMC接种至6孔培养板,分别加入PBS、SU5416(10<sup>-5</sup> mol/L)、VEGF(10 ng/ml)后置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中预孵6 h,弃去培养基,并用PBS清洗2遍,加入900  $\mu$ l培养基和100  $\mu$ l NaHS(10<sup>-3</sup> mol/L),60 s后,用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件测量并记录细胞长轴的长度,每孔随机选取10个细胞计算平均长度。细胞的舒缩用细胞给药前后的长度变化百分数来表示,正值为舒张,负值为收缩。

细胞变化百分数=(实验组细胞的平均长度-对照组细胞的平均长度)/对照组细胞的平均长度

$\times 100\%$ 。

**1.2.4 CCK-8增殖试剂盒检测VSMC增殖活力**在96孔板中接种细胞悬液(100  $\mu$ l/孔),每孔约2 000个细胞,将实验分为对照组、NaHS组、NaHS+SU5416组、VEGF(10 ng/ml)组,每孔细胞在给药24 h后加入10  $\mu$ l CCK-8溶液,37℃细胞培养箱中孵育3 h,酶标仪检测吸光度(optical density, OD)值。

**1.3 统计学处理** 采用graphpad6软件对实验数据进行分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 来表示。*t*检验用于比较两组之间差异,单因素方差分析用于分析两组浓度-效应曲线之间的显著性检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠BAs VSMC原代培养与鉴定** 组织贴壁法培养SD大鼠BAs VSMC,培养第5天,显微镜下可观察到有少量类长梭形或纺锤状细胞从组织块周围爬出,约15 d后细胞生长较多,以组织块为中心形成类似同心圆状的细胞晕,部分重叠,表现为典型的“峰”、“谷”状生长。图1A所示培养5、10、14 d的细胞状态。应用细胞免疫化学染色(抗 $\alpha$ -actin抗体)鉴定VSMC,结果如图1B显示,第一张为细胞核(蓝色),第二张细胞胞质内均能观察到阳性绿色荧光并呈长梭形,第三张为Merge图片。以上结果提示大鼠BAs VSMC原代培养成功。

**2.2 免疫化学方法鉴定VSMCs中VEGFR<sub>2</sub>表达** 使用抗VEGFR<sub>2</sub>抗体,应用免疫化学方法鉴定VSMCs中VEGFR<sub>2</sub>表达。结果如图2所示,可见VEGFR<sub>2</sub>在VSMC中显著表达,这为研究VEGFR<sub>2</sub>是否参与H<sub>2</sub>S介导的细胞迁移提供了基础。

**2.3 H<sub>2</sub>S促进VSMCs迁移** 如图3,与对照组相比,100  $\mu$ mol/L NaHS可显著提高VSMC的迁移能力( $P < 0.05$ );SU5416(10<sup>-5</sup> mol/L)处理组可明显降低NaHS对VSMC迁移能力的影响;与NaHS对VSMC迁移能力的作用相似,10 ng/ml VEGF同样显著促进大鼠BAs VSMC的迁移。以上结果表明,H<sub>2</sub>S可显著提高VSMC的迁移能力,且与VEGFR<sub>2</sub>有关。

**2.4 H<sub>2</sub>S对脑基底VSMC增殖的影响** 用CCK-8法检测H<sub>2</sub>S是否促进脑基底VSMC增殖,增殖能力用OD值表示(图4),VSMC用NaHS(10<sup>-4</sup> mol/L)刺激后,24 h后,NaHS组OD值均高于对照组( $P < 0.05$ ),提示H<sub>2</sub>S可促进VSMC的增殖;SU5416预处理组OD值明显降低NaHS对细胞增殖的促进作用

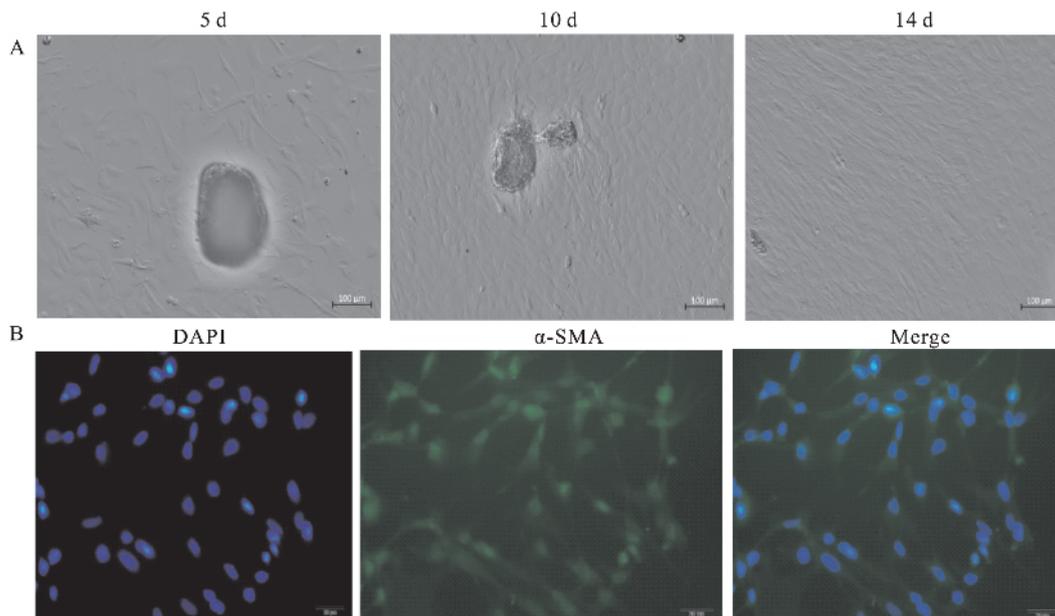


图1 原代大鼠脑基底 VSMC 的培养及鉴定 ×100  
A: 原代培养的 VSMC; B: VSMC 的鉴定

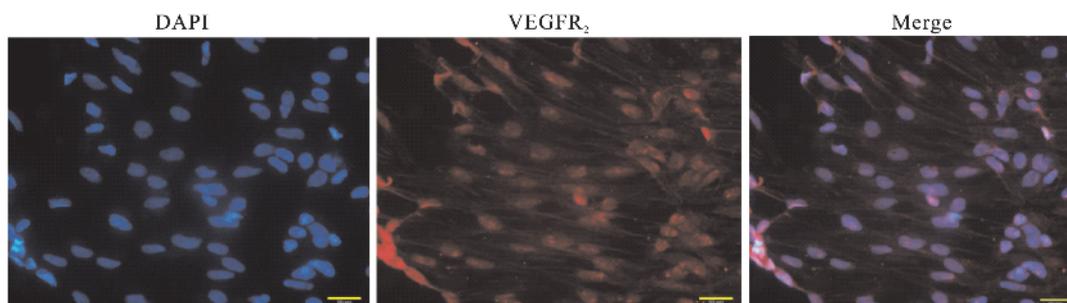


图2 大鼠脑基底 VSMC VEGFR<sub>2</sub> 的鉴定 ×100

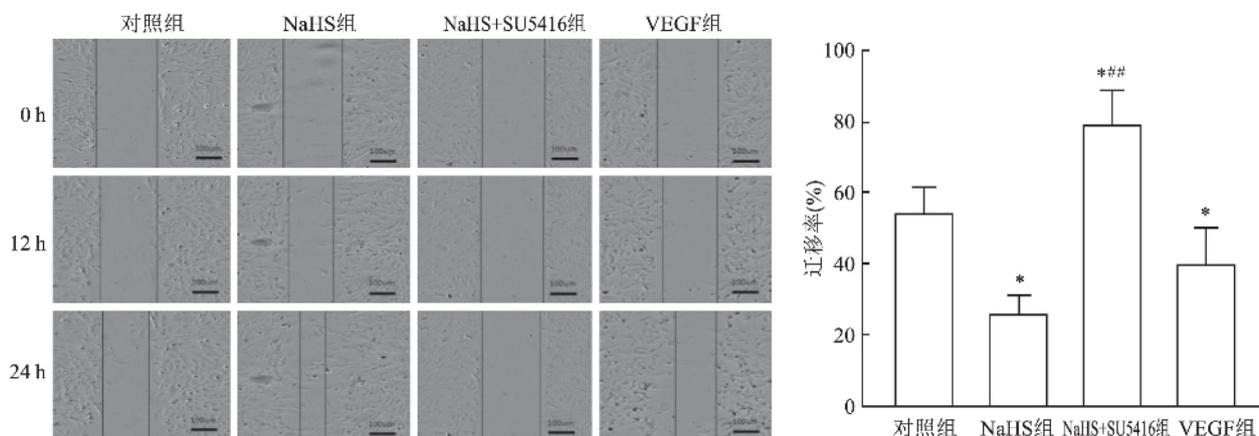


图3 NaHS 对 VSMC 迁移能力的影响  
与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 NaHS 组比较: \*\*  $P < 0.01$

( $P < 0.05$ ) ,该结果表明阻断 VEGFR<sub>2</sub> 抑制剂能够降低 H<sub>2</sub>S 促进 VSMC 增殖的作用 ,提示 H<sub>2</sub>S 氢介导的 VSMC 增殖可能与 VEGFR<sub>2</sub> 有关。

**2.5 H<sub>2</sub>S 对脑基底 VSMC 舒张的影响** NaHS 可显著提高 VSMC 的舒张作用 ( $P < 0.05$ ) ,如图 5 , SU5416 预处理组明显降低 NaHS 对细胞的舒张作

用( $P < 0.05$ )。以上结果表明  $H_2S$  对大鼠脑基底 VSMC 的舒张作用可能与激动  $VEGFR_2$  有关。

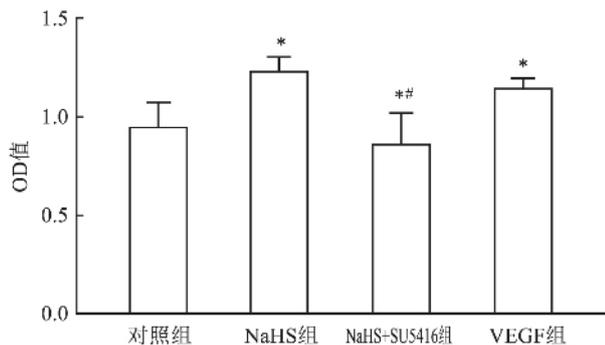


图4 NaHS 对 VSMC 增殖能力的影响

与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 NaHS 组比较: #  $P < 0.05$

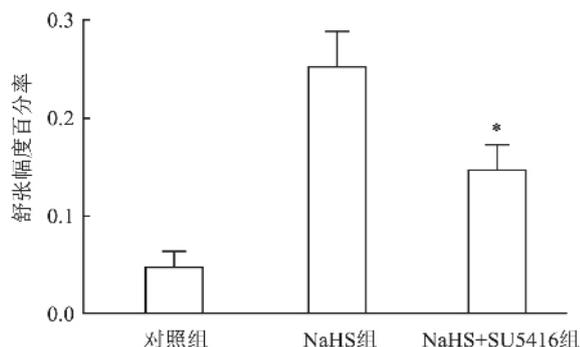


图5 NaHS 对 VSMC 舒张能力的影响

与 NaHS 组比较: \*  $P < 0.05$

### 3 讨论

作为除 NO 和 CO 之外的第三种气体信号分子,  $H_2S$  参与调节血管张力和血压<sup>[1,6]</sup>,且在体内起着重要的生理作用:保护肺纤维化<sup>[6]</sup>、心肌缺血再灌注损伤<sup>[7]</sup>等等。在冠状动脉缺血模型中, $H_2S$  具有血管生成作用<sup>[8]</sup>。众所周知,血管生成在伤口愈合的早期至关重要<sup>[9]</sup>,因此,研究  $H_2S$  对血管的生成、张力的调节及细胞的增殖、迁移成为新热点。

本实验中使用原代培养的大鼠 BA<sub>s</sub> VSMC,其细胞纯度高,活力好,实验所用细胞均为 4~5 代左右。本实验中采用的 NaHS 作为  $H_2S$  供体<sup>[2]</sup>,主要考虑以下几个方面:① NaHS 在溶液中解离成  $Na^+$  和  $HS^-$ , $HS^-$  和  $H^+$  结合形成  $H_2S$ 。 $H_2S$  气和 NaHS 在溶液中都是以的  $H_2S$ (1/3) 和  $HS^-$ (2/3) 形式存在,呈动态平衡。② 细胞培养液中  $Na^+$  浓度高达 150 mmol/L,而实验中给与 NaHS 后  $Na^+$  浓度增加  $\mu\text{mol/L}$  级别,这在细胞实验中可以忽略不计。③

本实验所用 NaHS 浓度较低,对溶液 pH 值没有影响,且目前国际上大都采用 NaHS 作为  $H_2S$  的供体进行实验。

本研究显示  $VEGFR_2$  在大鼠脑 BA<sub>s</sub> VSMC 中显著表达<sup>[10]</sup>,该研究结果是开展  $H_2S$  是否通过激动 VSMC 中  $VEGFR_2$  促进细胞增殖、迁移的研究的重要理论基础。其次,运用细胞划痕实验检测细胞的迁移能力。虽然开始的细胞划痕比较直,但是 24 h 后划痕边缘便会变弯曲,因为不同位置的细胞有不一样的迁移能力,之后用 Image-J 软件测算出迁移前后的距离,计算两者之差即为细胞的迁移距离,这样的数据更能准确反映细胞的迁移能力。

细胞的迁移和增殖的发生发展过程受到多种因子的调控,其中较为重要的因子是 VEGF。比如,VEGF 可通过激活血管内皮细胞中酪氨酸激酶受体 2,促进内皮细胞增殖和迁移<sup>[3]</sup>。本研究显示 10 ng/ml VEGF 可提高大鼠 BA<sub>s</sub> VSMC 的增殖和迁移,并促进 VSMC 的舒张,100  $\mu\text{mol/L}$  NaHS(外源  $H_2S$  供体)可同样促进血管 VSMC 的迁移、增殖和舒张功能,而  $10^{-5}$  mol/L SU5416( $VEGFR_2$  抑制剂)可明显降低 NaHS 对血管 VSMC 的增殖和迁移能力的影响,并降低 VSMC 的舒张幅度,以上结果提示  $H_2S$  促进 VSMC 的迁移、增殖和细胞舒张作用可能与激动  $VEGFR_2$  有关。

目前关于  $H_2S$  促进细胞增殖、迁移作用的一个重要限制是体外还原模型的研究<sup>[11]</sup>。虽然这些模型确实有实质性的有效性,但它们显然不能模拟体内复杂的细胞增殖、迁移及血管生成现象。这些复杂的现象在空间和时间上受到严格的调控,如细胞外基质的降解等等<sup>[12]</sup>。此外, $H_2S$  的信号传递被认为是通过硫酸盐化发生的,即半胱氨酸残基翻译后修饰为过硫酸盐。 $H_2S$  可通过通道蛋白硫化激活  $K_{ATP}$  通道<sup>[13]</sup>或增加大脑小动脉 VSMC  $Ca^{2+}$  火花频率激活 BK 通道,导致膜超极化和血管舒张<sup>[14]</sup>。综上所述,进一步思考  $H_2S$  对 VSMC 产生的增殖、迁移及舒张作用是通过作用于  $VEGFR_2$  中 S-S 键,引起下游通路的变化;或是导致  $VEGFR_2$  发生硫化。这需要更多的工作来描述  $H_2S$  在这些过程中的确切作用。

### 参考文献

- [1] Wang R. Two's company, three's a crowd: can  $H_2S$  be the third endogenous gaseous transmitter [J]. FASEB J, 2002, 16(13): 1792-8.

- [2] Polhemus D J, Lefer D J. Emergence of hydrogen sulfide as an endogenous gaseous signaling molecule in cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 2014, 114(4): 730–7.
- [3] Ferrara N, Gerber H P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors [J]. *Nat Med*, 2003, 9(6): 669–76.
- [4] Tao B B, Liu S Y, Zhang C C, et al. VEGFR<sub>2</sub> functions as an H<sub>2</sub>S-targeting receptor protein kinase with its novel Cys1045-Cys1024 disulfide bond serving as a specific molecular switch for hydrogen sulfide actions in vascular endothelial cells [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19(5): 448–64.
- [5] Smolich B D, Yuen H A, West K A, et al. The antiangiogenic protein kinase inhibitors SU5416 and SU6668 inhibit the SCF receptor (c-kit) in a human myeloid leukemia cell line and in acute myeloid leukemia blasts [J]. *Blood*, 2001, 97(5): 1413–21.
- [6] Guo W, Cheng Z Y, Zhu Y Z. Hydrogen sulfide and translational medicine [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(10): 1284–91.
- [7] Fan H N, Wang H J, Ren L, et al. Decreased expression of p38 MAPK mediates protective effects of hydrogen sulfide on hepatic fibrosis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(5): 644–52.
- [8] Testai L, Marino A, Piano I, et al. The novel H<sub>2</sub>S-donor 4-carboxyphenyl isothiocyanate promotes cardioprotective effects against ischemia/reperfusion injury through activation of mitoKATP channels and reduction of oxidative stress [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 113: 290–9.
- [9] Szabo C, Papapetropoulos A. Hydrogen sulphide and angiogenesis: mechanisms and applications [J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 164(3): 853–65.
- [10] Papapetropoulos A, Pyriochou A, Altaany Z, et al. Hydrogen sulfide is an endogenous stimulator of angiogenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(51): 21972–7.
- [11] Ishida A, Murray J, Saito Y, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells [J]. *J Cell Physiol*, 2001, 188(3): 359–68.
- [12] De Val S, Black B L. Transcriptional control of endothelial cell development [J]. *Dev Cell*, 2009, 16(2): 180–95.
- [13] Mustafa A K, Sikka G, Gazi S K, et al. Hydrogen sulfide as endothelium-derived hyperpolarizing factor sulfhydrates potassium channels [J]. *Circ Res*, 2011, 109(11): 1259–68.
- [14] Liang G H, Xi Q, Leffler C W, et al. Hydrogen sulfide activates Ca<sup>2+</sup> sparks to induce cerebral arteriole dilatation [J]. *J Physiol*, 2012, 590(11): 2709–20.

## Effect of hydrogen sulfide on migration, proliferation and relaxation of rat basal artery vascular smooth muscle cells

Chen Jinhua, Chen Zhiwu

(Dept of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the effect of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) on proliferation, migration and relaxation of rat basilar artery (BAs) smooth muscle cells (VSMC) and the relationship between H<sub>2</sub>S and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR<sub>2</sub>). **Methods** Primary cultured rat BAs VSMC. Specifically, immunofluorescence was used to identify the expression of VEGFR<sub>2</sub> in BAs VSMC. Cell scratch test was used to observe the change of migration ability of BAs VSMC. CCK-8 method was applied to detect the effect of H<sub>2</sub>S on the proliferation of BAs VSMC. Cell relaxation test was engaged to detect the relaxation ability of H<sub>2</sub>S on VSMC. **Results** The results of cell scratch and value-added experiments showed that, compared with the control group, exogenous H<sub>2</sub>S donor NaHS (100 μmol/L) could increase the proliferation and migration ability of BAs VSMC and promote VSMC relaxation ( $P < 0.05$ ). In addition, 10 ng/ml VEGF could also enhance the migration, proliferation and relaxation capacity of BAs VSMC, which was similar to the effect of NaHS. On the other hand, pretreatment with 10<sup>-5</sup> mol/L VEGFR<sub>2</sub> blocker SU5416 could reduce NaHS cell proliferation, migration and relaxation. **Conclusion** H<sub>2</sub>S can promote the proliferation, migration and cell relaxation of VSMC, which may be related to the stimulation of VEGFR<sub>2</sub>.

**Key words** hydrogen sulfide; smooth muscle cells; VEGFR<sub>2</sub>; proliferation; migration; relaxation