

高压对体外培养动脉中膜平滑肌细胞增殖及增殖相关蛋白和生长因子的影响

张峰², 张炎², 刘波¹, 姜宗来¹

(1.上海交通大学医学院力学生物学与医学工程实验室, 上海 200030;

2.第二军医大学解剖学教研室, 上海 200433)

摘要: 为了探讨力学因素在血管重建中的作用和机制, 观察在单纯高压条件下血管平滑肌细胞增殖及其相关蛋白和生长因子的变化。应用血管体外应力培养系统, 在施加单纯压力的条件下培养猪颈总动脉。按压力大小, 将培养的血管分为高压(21.3 kPa)组和正常压力(13.3 kPa)组。两组血管均分别培养1、4和7 d。免疫组织化学检测血管中膜平滑肌细胞的 α -肌动蛋白、增殖细胞核抗原、血小板源性生长因子A、转化生长因子 β 1及P53蛋白的变化。结果显示: 在高压力的作用下, 随着培养时间的延长, α -肌动蛋白呈减少的趋势; 增殖细胞核抗原、转化生长因子 β 1、P53持续增多; 血小板源性生长因子A先增加而后有所减少。说明高压对血管平滑肌细胞表型的转变, 发生增殖现象。提示高压可能通过调节血小板源性生长因子A、转化生长因子 β 1及P53蛋白的表达来调控血管平滑肌细胞的增殖。

关键词: 压力; 血管平滑肌细胞; 增殖; α -肌动蛋白; 生长因子

中图分类号: R543, R318.01

1 引言

高血压动脉重建是高血压病恶化的形态学基础, 也是高血压动脉基本的病理变化。因此, 高血压动脉重建研究被认为是揭示高血压疾病发生发展机制的途径之一。血管重建的基本过程包括细胞增殖和凋亡、细胞间作用和细胞外基质的产生, 而血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 的增殖和凋亡是血管重建的细胞学基础。大量研究表明, 动脉壁对血压增加的一个重要反应是由 VSMCs 增殖或肥厚引起的血管中膜面积增大^[1,2]。

许多研究结果表明, 压力、切应力与周向张力升高, 可引起血管壁细胞多种基因转录及表达上调, 包括血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、抑癌基因 p53 等^[3-6], 从而参与调节 VSMCs 的增殖。这些结果主要是利用整体动物模型得到的。整体动物模型中, VSMCs 增殖除了受压力因素的影响, 神经体液因素、切应力等也有重要作用。在研究机械应力与血管重建关系时, 很难排除神经、体液等多种因素作

用的影响, 更难以准确分析单纯压力对 VSMCs 的增殖具有何种作用。本文应用血管体外应力培养模型^[6,7], 对动脉血管施加单纯压力进行培养, 观察高压对动脉 VSMCs 增殖的影响, 并探讨 PDGF-A、TGF- β 1 及 P53 蛋白在其中的可能作用。

2 材料和方法

2.1 血管培养

应用血管体外应力培养模型, 控制单一且稳定的压力条件培养血管。取成年雄性金华猪颈总动脉 3~7 cm, 标记流入端, 记录在体长度。在 0~4°C D-Hanks 液中去血管周围组织, D-Hanks 液清洗 3 遍后, 固定于血管培养腔内, 结扎分支, 拉伸至在体长度, 检查无漏液后, 在培养腔内加 200 ml

收稿日期: 2004-01-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (10072075, 10132020, 30100060)

通讯作者: 姜宗来, 电话: (021)62932993,

传真: (021)62832528, E-mail: zjiang@sytu.edu.cn

培养液 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM+10%新生牛血清), 管道内加 70 ml 相同培养液进行灌流。启动蠕动泵, 调节平均流量为 ≤ 6 ml/h (仅供换液, 切应力极小, 可忽略不计), 调节后阻力与波形稳定装置, 使压力波动幅度 $\leq \pm 0.8$ kPa, 记录压力波形。隔天更换半量的培养液和灌流液。血管活性观察结果显示, 上述条件下培养的血管可以很好地存活 7 d 以上^[6,7]。

2.2 实验分组

根据施加压力的不同, 将培养的血管分为高压力组 (21.3 kPa, H 组, $n=6$) 和正常压力组 (13.3 kPa, M 组, $n=6$)。两组血管均分别培养 1、4 和 7 d。

2.3 实验内容

取 H 组和 M 组所有各时相点血管标本, 常规石蜡包埋切片, 厚 5 μm , 应用免疫组织化学方法检测: (1) α -肌动蛋白 (α -actin), 一抗为鼠抗人 α -actin。(2) 增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA), 一抗为鼠抗人 PCNA。(3) PDGF-A、TGF- β 1、P53 蛋白, 一抗分别为兔抗人 PDGF-A、兔抗人 TGF- β 1 及兔抗人 P53。抗体均由武汉博士德公司提供。

免疫组化步骤: 石蜡切片脱蜡后, 入新鲜配制的 3% H_2O_2 20 min, 以阻断内源性过氧化物酶, PBS 洗 3 min \times 3 次, 加入正常羊血清 (1:15), 37 $^\circ\text{C}$ 下放置 30 min; 加入一抗 (1:100), 4 $^\circ\text{C}$ 下湿盒过夜, PBS 洗 3 min \times 3 次, 加入生物素化羊抗兔第二抗体 (1:100), 37 $^\circ\text{C}$ 下放置 30 min, PBS 洗 3 min \times 3 次, 加入 ABC 液, 37 $^\circ\text{C}$ 下放置 30 min, PBS 洗 5 min \times 4 次, DAB 显色 5~10 min, 充分水洗 5 min, 常规脱水, 透明, 中性树脂封片。免疫组化试剂盒由武汉博士德公司提供。

2.4 结果分析

α -actin、PDGF-A、TGF- β 1 阳性细胞胞浆及 PCNA 和 P53 蛋白阳性细胞核均呈细颗粒状棕黄色沉淀 (照片中颜色较暗的部分)。两组血管每时相点各取 6 例标本, 每例标本随机取 6 张切片, 每张切片再取 4 个大小固定、相互垂直的视窗, 在 $\times 100$ 光镜下, 用计算机图像分析系统 (中国科学院自动化研究所开发) 计算免疫阳性反应产物的相对面积 (Aa % 值), 即组织中阳性染色面积与视窗

面积的百分比。所得数据进行统计处理, 组与组之间用 t 检验分析。

3 结 果

3.1 血管平滑肌细胞的表型

M 组和 H 组培养动脉的 VSMCs α -actin 阳性相对面积随培养时间的延长呈下降的趋势, 与 M 组相比, H 组阳性相对面积减少更明显 ($P < 0.05$), 见图 1。

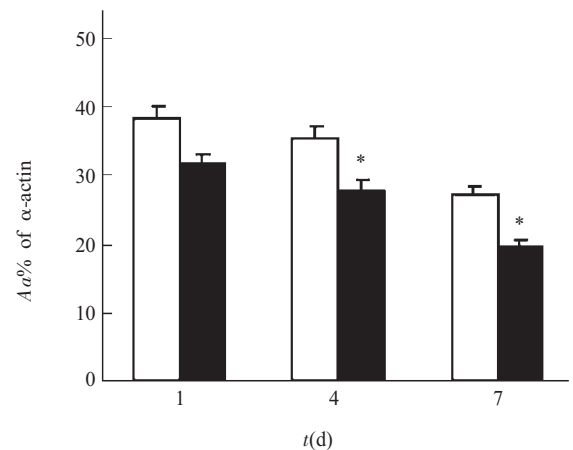
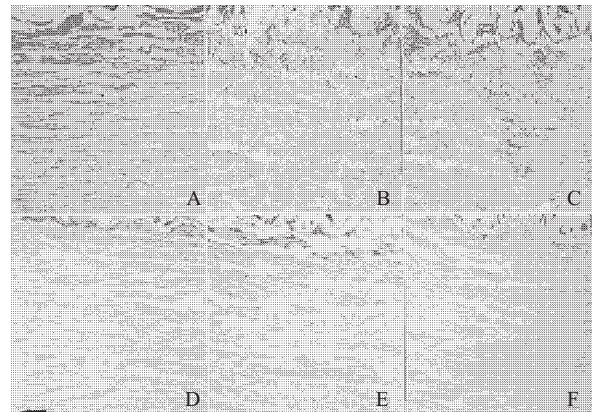


Fig.1 Immunohistochemistry and the Aa% of α -actin of common carotid arteries. (A) Cultured 1 day under medium pressure; (B) Cultured 4 days under medium pressure; (C) Cultured 7 days under medium pressure; (D) Cultured 1 day under high pressure; (E) Cultured 4 days under high pressure; (F) Cultured 7 days under high pressure. * $P < 0.05$ vs M group, $n=6$, Bar=22 μm . \square : M; \blacksquare : H

3.2 血管平滑肌细胞的增殖

H 组 VSMCs 的 PCNA 阳性细胞随培养时间

的延长，阳性相对面积逐渐增加；M 组的阳性相对面积也有增加的趋势，但仅在第 7 天有显著性差异 ($P < 0.01$)。H 组与 M 组相比，增加更为明显 ($P < 0.01$)，见图 2。

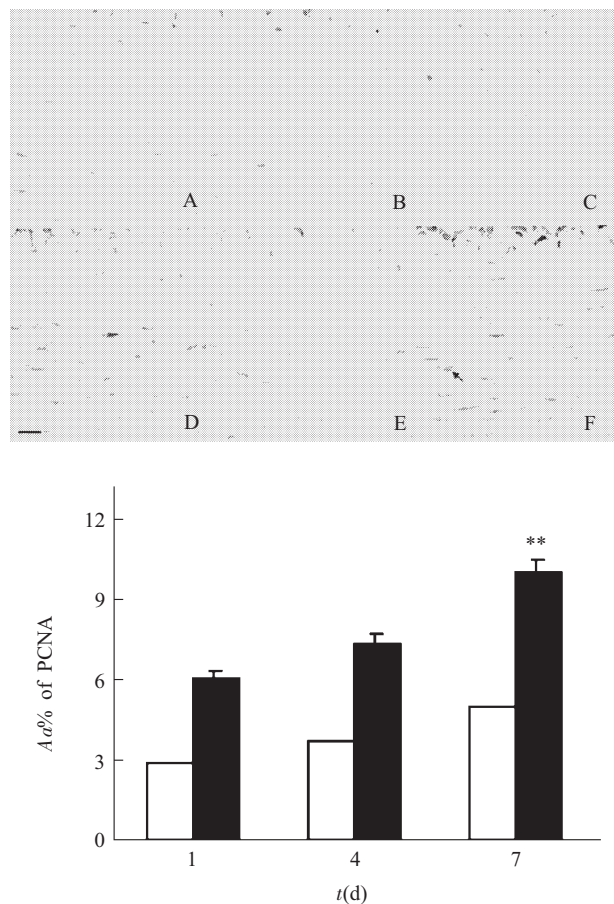


Fig.2 Immunohistochemistry and the Aa% of PCNA of common carotid arteries. (A), (B), (C), (D), (E), (F) are the same as in Figure 1. $**P < 0.01$ vs M group, $n=6$, Bar=22 μm . □: M; ■: H

3.3 PDGF-A 的表达

光镜下，可见 H 组、M 组体外培养的动脉 1、4 和 7 d 各时相点 VSMCs 胞浆内呈现深浅不一的棕黄色阳性颗粒，其中 H 组在培养的第 1 天和第 4 天 VSMCs PDGF-A 的表达均明显高于 M 组同时相点 ($P < 0.01$)。H 组第 7 天 VSMCs PDGF-A 的表达略有减少，但仍明显高于 M 组

($P < 0.01$)，见图 3。

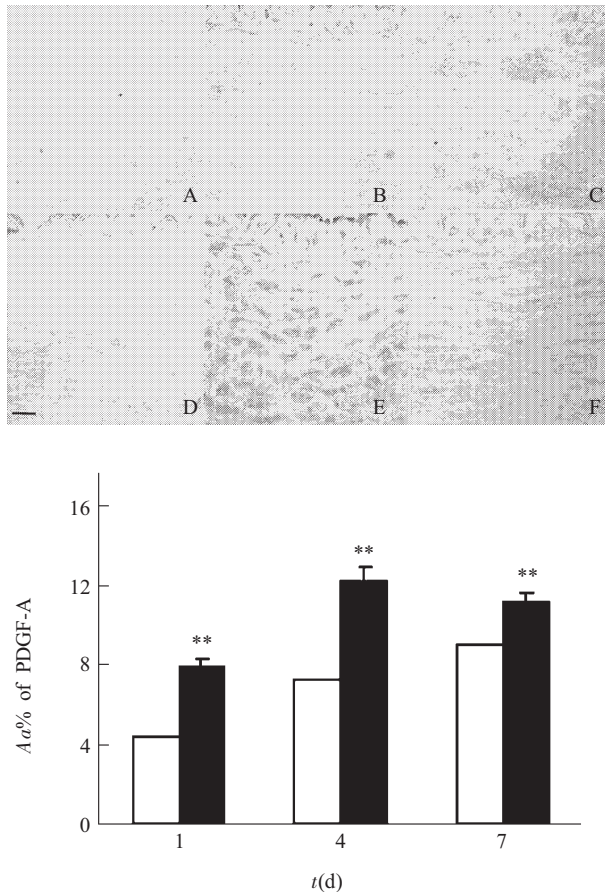


Fig.3 Immunohistochemistry and the Aa% of PDGF-A of common carotid arteries. (A), (B), (C), (D), (E), (F) are the same as in Figure 1. $**P < 0.01$ vs M group, $n=6$, Bar=22 μm . □: M; ■: H

3.4 TGF- β 1 的表达

M 组和 H 组各时相点的免疫反应结果随培养时间有逐渐增强的趋势；H 组各时相点阳性结果均明显高于 M 组 ($P < 0.05$)，见图 4。

3.5 P53 蛋白的表达

光镜下，培养的两组动脉 VSMCs 均出现阳性反应颗粒，且阳性反应都有逐渐增强的趋势。H 组各时相点阳性结果均明显高于 M 组同时相点 ($P < 0.01$)，见图 5。

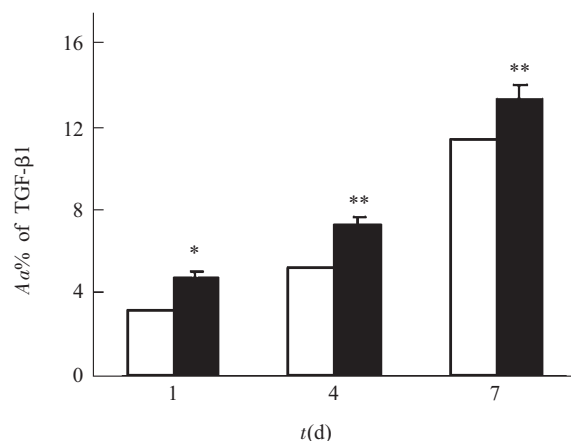
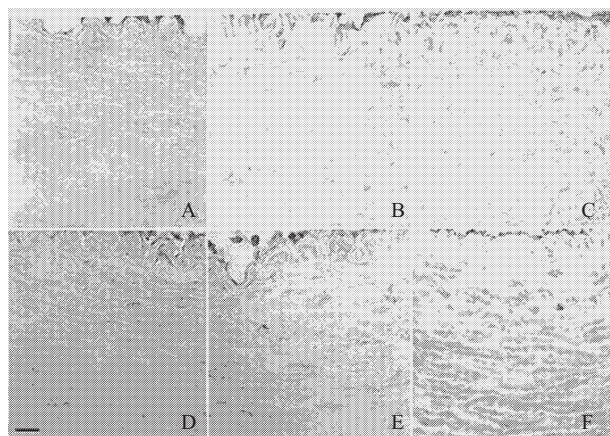


Fig.4 Immunohistochemistry and the Aa% of TGF- β 1 of common carotid arteries. (A), (B), (C), (D), (E), (F) are the same as in Figure 1. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs M group, $n=6$, Bar=22 μm . \square : M; \blacksquare : H

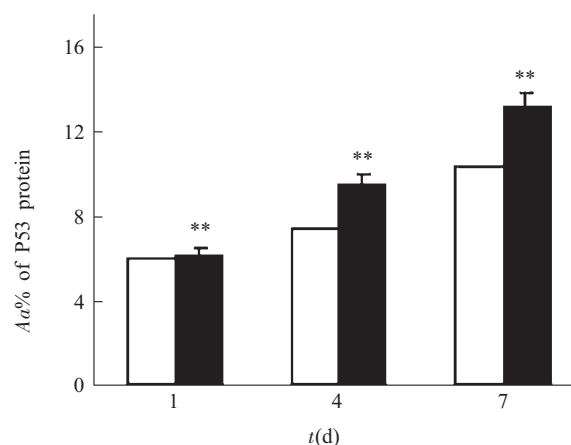
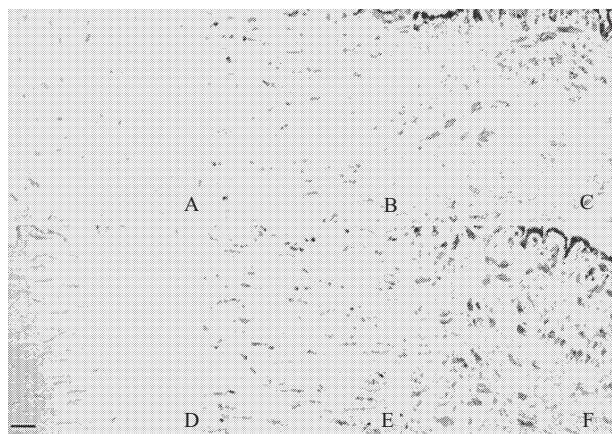


Fig.5 Immunohistochemistry and the Aa% of P53 of common carotid arteries. (A), (B), (C), (D), (E), (F) are the same as in Figure 1. ** $P < 0.01$ vs M group, $n=6$, Bar=22 μm . \square : M; \blacksquare : H

4 讨 论

4.1 血管平滑肌细胞的表型及增殖

VSMCs 的表型有收缩型与合成型两种, 收缩型 VSMCs 呈分化状态, 其内肌动蛋白以 α -actin 为主; 合成型 VSMCs 是去分化的细胞, 肌动蛋白以 β -actin 为主。本文观察到在高压条件下培养的血管, VSMCs 的 α -actin 阳性率有明显减少的趋势。结果表明, 高压作用下, VSMCs 由收缩型向合成型发生了转变。VSMCs 表型的转变是高血压动脉重建的细胞学基础之一。

大量研究表明, 高血压血管结构变化与 VSMCs 增殖和肥大有关。实验中常用 PCNA 免疫

组化法显示增殖细胞。PCNA 是增殖期细胞特异性表达的核蛋白, 主要由 G1 期和 S 期细胞表达, 与 DNA 合成相关, 在静止细胞, 其量很少^[8]。因此, 在研究细胞增殖状态时, PCNA 可作为一个重要指标^[9]。目前, PCNA 指标主要用于肿瘤细胞的研究中, 而很少用于高血压研究。本文结果显示, 高压作用下, 培养的颈总动脉 VSMCs 的 PCNA 呈阳性结果, 且随着时间的延长, 有明显增多的趋势, 而中等正常压力组变化趋势相对平缓。说明颈总动脉 VSMCs 在高压作用下, 细胞增殖功能有增强的趋势。这与在体高血压动物模型所观察到的结果相似, 提示压力升高是引起高血压动脉重建中 VSMC 增殖加强的重要原因。

4.2 高血压对培养动脉 PDGF-A、TGF- β 1 及 P53 蛋白表达的影响

血小板源性生长因子 (PDGF) 是一种重要的促细胞分裂剂, 可促进多种细胞的分裂和增殖。它有 3 个异构体: PDGF-A、PDGF-B 和 PDGF-AB。有研究表明, 原发性高血压大鼠的主动脉 VSMCs 分泌 PDGF-A 链较 PDGF-B 链更为明显^[9]; 自发性高血压大鼠 VSMCs 合成分泌 PDGF-A 也增加, 并明显促进 VSMCs 的增殖、肥大, 引起血管重建^[1]。本文在实验中主要观察了 PDGF-A 的变化情况, 结果显示, 高血压组 PDGF-A 的表达始终高于中等正常压力组, 提示 VSMCs 在高血压作用下, PDGF-A 合成、分泌增强。此外, 发现高血压组 PDGF-A 表达先增强后减弱, 推测其原因可能是刚开始施加高血压时, 刺激了 VSMCs 产生大量的 PDGF-A, 促使 VSMCs 异常活跃增殖, 以后由于 VSMCs 的增殖活动已消耗大量的 PDGF-A, 因而呈现 PDGF-A 减少的免疫组化反应结果; 也可能由于 VSMCs 对高血压刺激产生适应后, 使 PDGF-A 表达相对减少。

转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 是 TGF 超家族成员之一, 能调节多种细胞的生长、分化及细胞周围基质环境。一般认为, TGF- β 1 对 VSMCs 的生长有促进和抑制双重作用。有文献报道, TGF- β 1 是与凋亡密切相关的内源性调控因子。在体内外均可抑制细胞增殖, 同时也引起细胞的凋亡^[12]。另有研究认为, 高血压状态下, TGF- β 1 增加可以增强其它生长因子 (如 PDGF、bFGF、EGF 等) 对 VSMCs 增殖的促进作用^[13]。在本文中, VSMCs 受到单纯高压力的作用, TGF- β 1 有明显的表达, 且随着压力的升高和作用时间的延长, VSMCs 合成分泌 TGF- β 1 的能力增强。可以推测, TGF- β 1 在单纯高血压引起的动脉重建过程中起着促进 VSMCs 增殖的作用。

p53 基因有野生型和突变型两种。突变型 P53 蛋白抑制凋亡, 刺激和促进细胞的异常生长, 野生型 P53 蛋白可抑制细胞增殖并诱导凋亡。有研究表明, 流体切应力可通过 C-Jun 氨基端激酶途径引起、诱导血管内皮细胞 p53 磷酸化, 从而使 P53 蛋白表达增加, 且此作用是时间依赖性的^[14]。这说明切应力可引起 P53 蛋白的表达变化。那么, 不同的压力是否也可以引起 VSMCs 中 P53 蛋白的变化呢? 目前研究仍较少。因此, 我们观察了单纯高血压引起的血管重建过程中 p53 基因表达的变化。

本文结果表明, 与正常压力组比较, 高血压组 VSMCs 有较多的 P53 蛋白表达。有文献报道, 免疫组织化学检测 P53 蛋白结果显示都是突变型^[15]。因此, 本文结果提示, P53 蛋白表达所起的作用是促进 VSMCs 的增殖; 高血压条件培养的动脉 p53 基因发生了突变, 表达产生突变型 P53 蛋白, 从而调控 VSMCs 的增殖。

参考文献:

- [1] Heagerty AM, Aalkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth. *Hypertension*, 1993,21(4):391~397
- [2] Nakayama M, Fukuda N, Watanabe Y, Soma M, Hu WY, Kishioka H, Satoh C, Kubo A, Kanmatsuse K. Low dose of eicosapentaenoic acid inhibits the exaggerated growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats through suppression of transforming growth factor-beta. *J Hypertens*, 1999,17(10):1421~1430
- [3] Sarzani R, Arnaldi G, Chobanian AV. Hypertension-induced changes of platelet-derived growth factor receptor expression in rat aorta and heart. *Hypertension*, 1991,17(6Pt2): 888~895
- [4] Hamet P, Hadrava V, Kruppa U, Tremblay J. Transforming growth factor β 1 expression and effect in aortic smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 1991, 17(6Pt2):896~901
- [5] Li Q, Muragaki Y, Hatamura I, Ueno H, Ooshima A. Stretch-induced collagen synthesis in cultured smooth muscle cells from rabbit aortic media and a possible involvement of angiotensin II and transforming growth factor-beta. *J Vasc Res*, 1998,35(2):93~103
- [6] 刘艳春, 姜宗来, 刘波, 张峰, 张炎, 李玉泉. 低切应力对体外培养动脉的平滑肌细胞增殖和凋亡的影响. *医用生物力学*, 2002,17(4):198~203
- [7] 刘波, 姜宗来, 张炎, 刘艳春, 覃开荣, 杨向群. 血管体外应力培养系统: 一种新的血管生物力学实验模型. *医用生物力学*, 2001,16(4):225~230
- [8] Ridgri B, Rarner F, Patricia AB, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature*, 1987,326(6112):515~517
- [9] Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms.

- J Pathol*, 1990,162(4):285~294
- [10] Kitami Y, Fukuoka T, Hiwada K, Inagami T. A high level of CCAAT-enhancer binding protein- δ expression is a major determinant for markedly elevated differential gene expression of the platelet-deprived growth factor- α receptor in vascular smooth muscle cells of genetically hypertensive rats. *Circ Res*, 1999,84(1):64~73
- [11] 晋军, 祝善俊, 祝之明, 杨永健, 丁钢. 自发性高血压大鼠中血小板源生长因子-AA及其受体表达与血管平滑肌细胞增殖的关系. *生理学报*, 2002,54(2):145~148
- [12] Tsukada T, Eguchi K, Migita K, Kawabe Y, Kawakami A, Matsuoka N, Takashima H, Mizokami A, Nagataki S. Transforming growth factor beta 1 induces apoptotic cell death in cultured human umbilical vein endothelial cells with down-regulated expression of bcl-2. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995,210(3):1076~1082
- [13] Saltis J, Agrotis A, Bobik A. TGF-beta 1 potentiates growth factor-stimulated proliferation of vascular smooth muscle cells in genetic hypertension. *AJP-Cell Physiology*, 1992,263(2):420~428
- [14] Lin K, Hsu PP, Chen BP, Yuan S, Usami S, Shyy JY, Li YS, Chien S. Molecular mechanism of endothelial growth arrest by laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000,97(17):9385~9389
- [15] Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, 1991,351(6326):453~456

EFFECTS OF HIGH PRESSURE ON PROLIFERATION AND PROLIFERATION-ASSOCIATED PROTEINS AND GROWTH FACTOR OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS OF ORGAN-CULTURED ARTERY

ZHANG Feng², ZHANG Yan², LIU Bo¹, JIANG Zong-lai¹

(1. Laboratory of Mechanobiology and Medical Engineering, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200030, China ;

2. Department of Anatomy, The Second Military Medical university, Shanghai 200433, China)

Abstract: In order to explore effect and mechanism of mechano-factors in vascular remodeling, proliferation and expressions of proliferation-associated proteins, such as P53 protein, and some growth factors of VSMCs were observed in an intact artery exposed to the high pressure merely. Common carotid arteries of pigs were cultured at 37°C with DMEM containing 10% newborn calf serum at a constant flow rate of no more than 6 ml/h under high pressure (21.3 kPa) and normal pressure (13.3 kPa) for 1, 4 and 7 days respectively in a vascular organ-cultured system *in vitro*. The expressions of α -actin, PCNA, P53 protein and PDGF-A and TGF- β 1 were tested with immunohistochemical method. The expression of α -actin decreased continuously and the expressions of PCNA, P53 protein and TGF- β 1 increased within 7 days in group of high pressure. The expression of PDGF-A increased at first and then decreased slightly within 7 days. VSMCs of the artery underwent a transformation from contractile phenotype to synthetic phenotype and the proliferation rate of VSMCs enhanced under the high pressure. These results suggested that the high pressure may affect the proliferation of VSMCs through regulating expression of PDGF-A, TGF- β 1 and P53 protein in organ-cultured artery *in vitro*.

Key Words: Pressure; Vascular smooth muscle cells; Proliferation; α -actin; Growth factor