

血管损伤影响离体平滑肌细胞增殖与钙稳态有关

刘乃奎 王雪青 董林旺 赵民清 唐朝枢 苏静怡

(北京医科大学心血管基础研究所病理生理研究室, 北京 100083)

Effect of Vascular Injury on the Proliferation of Cultured Smooth Muscle Cells Is Involved in Calcium Homeostasis

LIU Nai-Kui, WANG Xue-Qing, DONG Lin -Wang, ZHAO Min -Qing, TANG Chao-Shu and SU Jing-Yi
(Laboratory of Cardiovascular Pathophysiology, Institute of Cardiovascular Research, Beijing Medical University, Beijing 100083, China)

ABSTRACT Vascular smooth muscle cells (VSMC) cultured from the rat aorta at 3 and 10 days after balloon denudation. Results showed that activity of VSMC proliferation increased significantly, synthesis of DNA and protein accelerated, and cell count increased. During VSMC proliferation, calcium influx increased, calcium content elevated. $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Verapamil inhibited not only the changes of calcium homeostasis, but also vascular injury induced SMC proliferation. These findings indicated that vascular injury induced VSMC proliferation. Disturbances of calcium homeostasis might be one of cellular mechanisms of vascular injury induced VSMC proliferation.

KEY WORDS Vascular injury; Vascular smooth muscle cell proliferation; Calcium homeostasis

摘要 本实验采用球囊剥脱术在体损伤血管,于术后3天和10天取出血管做平滑肌细胞培养。结果发现,血管损伤后血管平滑肌细胞增殖活性显著增加,DNA和蛋白质合成加速,细胞数目增多。在血管平滑肌细胞增殖过程中,钙内流增加,胞内钙含量升高。应用 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 异搏定不但对钙稳态变化有一定的抑制作用,而且还对血管损伤诱导的平滑肌细胞增殖有抑制作用。这些结果提示血管损伤可致血管平滑肌细胞增殖;钙稳态失衡可能是血管损伤诱导血管平滑肌

细胞增殖的细胞学机制之一。

关键词 血管损伤; 平滑肌细胞增殖; 钙稳态

自 Gruentzig^[1]于1977年首次开展经皮穿刺冠状动脉腔内成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)治疗冠状动脉粥样硬化所致的狭窄性病变以来,现已广泛应用于临床。随着PTCA技术的不断改进和提高,PTCA首次成功率可达90%~95%,然而至今仍有25%~35%的患者在成功的PTCA后3~6个月内出现了原扩张部位的再狭窄(restenosis)^[2]。目前对再狭窄的发生机制尚未完全明了,且无有效的防治措施,因此,再狭窄严重地限制了PTCA的应用和推广,是亟待研究解决的问题。

大量的整体动物研究结果表明,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)增殖是再狭窄的核心问题,是血管壁对损伤反应的基本病理过程^[3]。本实验采用细胞培养技术,从细胞水平上探讨血管损伤对VSMC增殖的影响及其机制,以便为阐明再狭窄的发生机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 大鼠球囊内皮剥脱模型^[4]

选用270~350g雄性Wistar大鼠,随机分为剥脱组和假手术组(对照组)。剥脱组用0.6%戊巴比妥钠($5 \text{ml} \cdot \text{kg}^{-1}$,腹腔注射)麻醉动物,分离出左颈总动脉,经此插入自制的2F球囊导管至腹主动脉,注入0.1ml生理盐水扩张球囊,反复抽拉3次,剥脱胸主动脉内皮;假手术组动物除不插入球囊导管外,其余操作同剥脱组。

1.2 血管平滑肌细胞培养

取内皮剥脱后3天和10天及其相应假手术组大

鼠主动脉,剪成 1 mm² 大小,按 Ross 法^[5]在 37℃ 5% CO₂ 孵箱中,用含 15% 小牛血清的 MEM 培养液传代培养。实验用第 3 代细胞。

1.3 ³H-TdR 和 ³H-亮氨酸掺入^[6]

首先用含 0.5% 小牛血清的 MEM 培养液培养 10⁶ VSMC 24 h,使 SMC 同步化增殖于 Go 期,然后改换加入 15% 小牛血清的 MEM 培养液,同时分别加入 1.85 × 10⁴ Bq ³H-TdR 或 1.85 × 10⁴ Bq ³H-亮氨酸培养 24 h 后,迅速用 Millipore 抽滤(0.45 μm 微孔滤膜),测定滤膜的放射性强度。

取 5 × 10⁴ VSMC 置于 0.5% 小牛血清的 MEM 培养液中,培养 24 h,使 SMC 同步化增殖于 Go 期,然后改换加入 15% 小牛血清的 MEM 培养液培养 24 h,用血细胞计数板进行细胞计数,根据下列公式计算 Doubling time(倍增时间):

$$\text{Doubling time(h)} = \frac{(t_2 - t_1) \times \log 2}{(\log N_1 - \log N_2)}$$

式中 t 为时间; N 为细胞数。

1.4 细胞钙含量测定

取 10⁷ VSMC 于 110℃ 烤干,经消化后于 Perkin-Elmer 703 型原子吸收分光光度计测定各样品钙含量。

1.5 细胞外钙内流

按 Miasiro 等^[7]的方法测 VSMC 钙内流。用 PSS 冲洗细胞 3 次,然后将 10⁶ VSMC 置于 PSS 中,37℃ 孵育 15 min,加入 3.7 × 10⁴ Bq ⁴⁵Ca,37℃ 孵育 5 min,用无 Ca²⁺ 2 mmol EGTA-PSS (4℃) 冲洗 2 次,终止 ⁴⁵Ca 内流,加入闪烁剂后测细胞放射性强度。

PSS 成份为 (pH 7.4, mmol · L⁻¹): NaCl 140, KCl 5, CaCl₂ 1.5, MgCl₂ 1, Glucose 10, Hepes 10。

无 Ca²⁺ - 2 mmol EGTA-PSS: 用 2 mmol EGTA 代替 PSS 中的 1.5 mmol CaCl₂。

1.6 统计学处理

所有数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组之间比较用 t 检验。

2 结果

2.1 血管损伤对培养平滑肌细胞增殖的影响

血管损伤后 3 天的组织碎块在贴壁后 2~3 天就有 SMC 长出(30%),到 7 天时几乎全部组织碎块均已长出 SMC,细胞处于融合状态(confluence)。损伤后 10 天的血管组织碎块贴壁培养后的生长状态与损伤后 3 天的类似。对照组血管组织碎块在贴壁培养后 4 天开始有 SMC 长出(10%),7 天时约有 70% 的组织碎块长出 SMC,在 10~12 天时细胞处于生长融合状态。³H-TdR 和 ³H-亮氨酸掺入实验显示,剥脱组 SMC DNA 合成和蛋白质合成明显快于对照组。损伤 3 天的 SMC ³H-TdR 和 ³H-亮氨酸掺入分别为对照组的 3 倍(P < 0.01)和 1.9 倍(P < 0.01, Table 1);血管损伤后 3 天和 10 天的 SMC 计数和 ³H-TdR 掺入分别增加了 26% 和 40.7% (计数)及 200% 和 246% (³H-TdR 掺入),SMC 的倍增时间(doubling time)分别比对照组减少了 43.6% 和 38.7% (P < 0.01, Table 1)。

Table 1. Influence of vascular injury in on cultured SMC proliferation ($\bar{x} \pm s$).

	control group		experimental group	
	3 days	10 days	3 days	10 day
cell count (×10 ⁵)	3.1 ± 0.7(6)	2.7 ± 0.2(8)	3.9 ± 0.5(6) ^a	3.8 ± 0.2(8) ^b
doubling time (h)	39.7 ± 5.1(6)	38.7 ± 6.1(8)	27.6 ± 5.4(6) ^b	27.9 ± 2.2(8) ^b
³ H-TdR (cpm)	845.6 ± 84.7(6)	853.3 ± 96.5(6)	2 536.9 ± 303.7(6) ^b	2 953.0 ± 443.8(6) ^b
³ H-leucine (cpm)	1 198.2 ± 237.4(6)		2 225.5 ± 332.9(6) ^b	

a: P < 0.05, b: P < 0.01 compared with control group.

2.2 血管损伤引起平滑肌细胞增殖的机制

损伤后 3 天和 10 天的 VSMC 的钙内流增多,胞浆钙含量升高,与对照组相比,钙内流分别增加了 25.5% 和 23.7% (P < 0.01);钙含量

分别增加了 43.2% 和 44.4% (P < 0.05, Table 2);将 10 μmol · L⁻¹ 异搏定加入到剥脱组培养液中与 VSMC 预孵育 15 min,然后测 5 min 的钙内流,结果发现异搏定使剥脱组 SMC

钙内流降低了 35% ($P < 0.05$); $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 异搏定与 SMC 预孵育 24 h, 结果使剥脱组 SMC 钙含量降低了 21.3% ($P < 0.01$, Figure)。10

$\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 异搏定也可使剥脱组 VSMC ^3H TdR 和 ^3H -亮氨酸掺入减少 43% 和 58% ($P < 0.01$, Figure)。

Table 2. Changes of ^{45}Ca -influx and Ca^{2+} content cultured VSMC after balloon denudation (nmol $\text{Ca}^{2+}/10^6$ cells, $\bar{x} \pm s$).

Group	^{45}Ca -influx (5 min)		Ca^{2+} content	
	3 days	10 days	3 days	10 days
control	3.283 ± 0.3(6)	3.308 ± 0.3(9)	695.0 ± 82.1(6)	709.3 ± 77.2(6)
experimental	4.120 ± 0.7(6) ^a	4.091 ± 0.6(9) ^b	995.0 ± 0.1(6) ^b	1 021.6 ± 230.0(6) ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$ compared with control group.

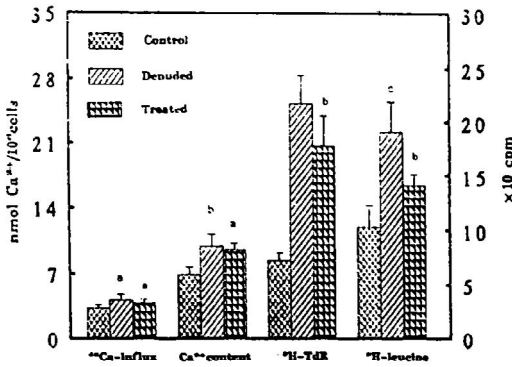


Figure. Influence of Verapamil on ^{45}Ca -influx Ca^{2+} content, ^3H -TdR and ^3H -leucine incorporation in cultured VSMC from the rat aorta 3 days after balloon denudation. Treated: denuded + $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Verapamil, Ca^{2+} content = $\times 10$ nmol $\text{Ca}^{2+} \cdot \text{cells}^{-1}$; a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$; c: $P < 0.001$; denuded vs control, treated vs denuded.

3 讨论

细胞培养技术对从细胞水平上探讨某些疾病的发病机制具有十分重要的意义。虽然近年来细胞培养技术已被广泛地应用于 VSMC 的增殖动力学和形态学研究中,但是关于采用细胞培养技术研究机械性损伤对 SMC 增殖影响的文献报道甚少。本实验采用大鼠球囊内皮剥脱模型,离体培养 VSMC,观察 SMC 的增殖变化,并探讨其变化的可能机制。结果表明,血管在体损伤后,其 SMC 增殖活性显著增加,DNA

合成加快,细胞倍增时间缩短,细胞数目增多。这些变化与大鼠、兔、猪等动物的整体实验研究的结果相一致^[3]。1984 年 Grunwald 和 Hundenschild^[8]培养在体受损的血管 SMC 时发现, VSMC 在第 3 代时还保持着体内时的功能状态。1986 年 Walker 等^[9]用球囊内皮剥脱后增生的血管内膜 SMC 做培养时发现,第 2 代的 VSMC 可产生高于对照组 5 倍的血小板生长因子样物质。这些结果一方面提示离体培养的细胞可保持体内时的功能状态,反映在体时的变化情况,从而利用细胞培养技术探讨血管机械性损伤导致 SMC 增殖的机制提供了可能性;另一方面又从细胞水平上进一步证明,血管损伤后,在体的 SMC 处于增殖活动状态。

钙是细胞内第二信使,是调控细胞增殖的关键性信号。细胞内钙浓度升高是 SMC 增殖的有效刺激^[10]。本研究发现,血管损伤后 VSMC 钙内流增加,钙含量升高; $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 异搏定不但对这些变化有一定的抑制作用,而且还对血管损伤诱导的 SMC 增殖有一定的抑制作用,提示钙稳态失衡可能是血管损伤诱导 VSMC 增殖的细胞学机制之一。调整钙稳态失衡对于 PTCA 后再狭窄可能具有一定的临床防治应用价值,值得进一步探讨。

参考文献

1 Grüntzig AR, Myler RK, Hanna EH, et al. Coronary transluminal angioplasty (abstract). *Circulation*, 1977, **84** (Suppl 1): I 55~ I 56.

- 2 Klein LW, Rosenblum J. Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Prog Cardiovasc Des*, 1990, **32**: 365~382.
 - 3 Ip SH, Fuster V, Badimon FL, et al. Syndromes of accelerated atherosclerosis: Role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J Am Coll Cardiol*, 1990, **15**: 1 667.
 - 4 Clowes AW, Shwartz SM. Significance of quiescent smooth muscle migration in the injured rat carotid artery. *Circ Res*, 1985, **56**: 139.
 - 5 Ross R. The smooth muscle cell I growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol*, 1971, **50**: 172.
 - 6 Roe MW, Hepler HR, Harden K, et al. Platelet-derived growth factor and angiotensin cause increases in cytosolic free calcium by different mechanisms in vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, 1989, **139**: 100.
 - 7 Miasiro N, Ymanoto H, Kanaide H, et al. Dose endothelin mobilize calcium from intracellular store site in rat aortic vascular smooth muscle cells in primary culture? *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, **156**: 312.
 - 8 Grunwald J, Haudenschild CC. Intimal injury in vivo activates vascular smooth muscle cell migration and explant outgrowth in vitro. *Arteriosclerosis*, 1984, **4**: 183~188.
 - 9 Walker LN, Bowen-Pope DF, Ross R, et al. Production of platelet-derived growth factor-like molecules by cultured arterial smooth muscle cells accompanies proliferation after arterial injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**: 7 311~15.
 - 10 Metcalfe TC, Meore JP, Smith CA, et al. Calcium and cell proliferation. *Br Med Bull*, 1986, **42**: 405.
- (本文 1995-03-20 收到, 1995-08-26 修回)