

血小板源生长因子诱导血管平滑肌细胞迁移及机制

谢良地 吴可贵 陈达光 A.D. Hughes^① Z. Clunn^① J. Lymn^①

(福建医科大学附属第一医院心内科, 福建省高血压研究所, 福州 350005)

Mechanism Involved in the Migration of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Platelet-derived Growth Factor

XIE Liang-Di, WU Ke-Gui, CHEN Da-Guang, A. D. Hughes^①, Z. Clunn^① and J. Lymn^①

(Hypertension Division, First Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China)

ABSTRACT

Aim To investigate the intracellular signalling related to the migration promoted by platelet-derived growth factor (PDGF).

Methods Cultured smooth muscle cells (SMC) derived from rats (A7r5) were used. Modified Boyden chamber technique was employed for migration assessment. Intracellular free calcium ion concentration ($[Ca^{2+}]_i$) was measured using Fura-2.

Results PDGF-BB promoted migration of SMC and caused an increase in $[Ca^{2+}]_i$ of SMC, with peak response at concentration of PDGF 5 $\mu\text{g/L}$. The migration and increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by PDGF were markedly inhibited by 100 $\mu\text{mol/L}$ BAPTA ($\Delta[Ca^{2+}]_i$ 197 \pm 30 vs 17.7 \pm 6 nmol/L, $P < 0.01$), a calcium chelator, and 50 $\mu\text{mol/L}$ genistein, a tyrosine kinase inhibitor.

Conclusion The increase in plasmic ionic calcium is one of early intracellular signalling after interaction of PDGF and SMC. The migration of SMC induced by PDGF is either calcium dependent or tyrosine kinase dependent.

KEY WORDS Platelet-derived growth factor; Smooth muscle cell; Migration; Intracellular free

calcium

摘要 为探讨血小板源生长因子诱导血管平滑肌细胞迁移和细胞内信号传递机制。以体外培养的平滑肌细胞为对象,用血小板源生长因子 BB 二聚体作诱导刺激物,采用改良的 Boyden 微孔膜双槽法进行细胞迁移实验,荧光染料 Fura-2 法测定细胞内游离钙离子浓度。结果发现,血小板源生长因子 BB 二聚体能明显诱导体外培养的平滑肌细胞迁移,使细胞内游离钙离子浓度 ($[Ca^{2+}]_i$) 明显升高 ($P < 0.01$),峰值浓度位于 5 $\mu\text{g/L}$ 。100 $\mu\text{mol/L}$ 钙离子螯合剂 BAPTA 和酪氨酸激酶抑制剂 50 $\mu\text{mol/L}$ Genistein 既能抑制血小板源生长因子-BB 诱发的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,也能抑制血小板源生长因子对平滑肌细胞的诱导趋化迁移作用。实验结果提示,血小板源生长因子是诱导平滑肌细胞迁移的趋化物; $[Ca^{2+}]_i$ 升高是平滑肌细胞对血小板源生长因子反应的早期细胞内信号传递通路之一;血小板源生长因子诱发的平滑肌细胞迁移既依赖于 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,又依赖于酪氨酸蛋白激酶活性。

关键词 血小板源生长因子;平滑肌细胞;迁移;细胞内游离钙离子

血管平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 从中膜向内膜下迁移并且增殖,之后捕获和储存大量的胆固醇和脂质,成为“泡沫细胞”而构成动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 斑块的主要成分。这一过程也是冠心病患者行经皮腔内冠状动脉成形术 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 后发生再狭窄的机制之一^[1~4]。因此,平滑肌细胞从中膜向内膜下迁移的机制是近年来许多学者研究的焦点。已知许多生长因子,如血小板源性生长因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 和碱性纤维母细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF); 细胞外基质分子,如血

栓粘合蛋白(thrombospondin, TSP);纤维连接蛋白(fibronectin, Fn);淋巴因子如集落刺激因子(colony stimulating factor, CSF)等均有诱导趋化平滑肌细胞从中膜向内膜下迁移的作用^[1~7]。但是,细胞迁移的机制和具体过程以及细胞内的信号传递还不清楚。细胞内游离钙离子 $[Ca^{2+}]_i$ 除了作为细胞内重要的第二信使物质,介导许多生物学信号传递,与细胞的兴奋、代谢、增殖和分化有关之外,还作为细胞兴奋收缩耦联的必备物质,参与细胞的变形、运动与肌细胞的收缩。本文研究血小板源生长因子对培养的SMC的迁移的诱导作用以及对SMC $[Ca^{2+}]_i$ 的影响,目的在于探讨SMC在As过程中的细胞生物学变化以及可能的机制。

1 材料和方法

1.1 试剂

钙离子螯合剂1,2-二(2-氨基乙氧基)乙烷-N,N',N'-四乙酸[1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N',N'-tetraacetic acid; BAPTA-AM]购自Calbiochem; Fura-2 AM购自Molecular Probes;人类重组血小板源生长因子二聚体(PDGF-BB)和二甲基亚砜(DMSO)为Gibco公司产品; Genistein、HEPES、Digitonin、Gelatin和血管加压素(vasopressin, VP)为Sigma公司产品。

1.2 平滑肌细胞来源及培养

采用组织块外生法培养胚胎大鼠主动脉(A7r5)。所有实验采用培养的第7~30代A7r5细胞系^[8,9]。传代细胞接种于80 cm²的培养瓶中,用Dulbecco's MEM培养,加入4 mmol/L Glutamax-1、青霉素100 ku/L、链霉素100 g/L和10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)。培养瓶置于37℃培养箱,通入5%二氧化碳。所有实验均采用培养接近融合的细胞进行。

1.3 培养的平滑肌细胞迁移实验

聚碳酸酯微孔膜用0.01% Gelatin煮沸2 h,凉干后备用。采用改良的Boyden微孔膜双槽法进行细胞迁移实验,下槽液体用含1 g/L牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)的无血清DMEM,加入不同浓度的趋化刺激物,用8 μm孔径的聚碳酸酯微孔膜隔开上下槽;上槽加入0.4 mL密度 2.5×10^5 cells/L的细胞悬液(细胞总数为 1×10^5)。置于37℃二氧化碳培养箱,温育5 h后弃去上槽细胞悬液,聚碳酸酯微孔膜移至染色架,用

100%酒精固定1 min, Toluidine 兰染色5 min后,用棉签轻轻刮去聚碳酸酯微孔膜朝上槽一面留下多余的细胞,压片固定。留在膜上的则为移行通过微孔附着在聚碳酸酯膜朝下槽面的SMC^[2]。用相差显微镜,计算任意5个高倍视野($\times 200$)的细胞数,取平均值。每个浓度做复管。

1.4 细胞内游离钙离子浓度 $[Ca^{2+}]_i$ 测定

已生长融合的培养SMC,加入终浓度为5 μmol/L的Fura-2 AM 37℃温育90 min,除去培养液,用PSS轻轻冲洗细胞2次,去除多余的染料,用5 mL 0.25%胰蛋白酶短时间消化,使细胞脱离培养瓶底,用含10% FBS的MEM中和胰酶后离心,加入约20 mL含1 mmol/L Ca^{2+} 的磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)[各种物质的浓度(mmol/L)为:NaCl 127, KCl 5.9, $MgCl_2$ 1.2, $CaCl_2$ 1, glucose 14, HEPES 10.6 pH 7.2]制备细胞悬液。在37℃环境中,用双波长荧光分光光度计(Deltascan),取激发波长340和380 nm,发射波长510 nm,测定荧光强度;记录静息状态下荧光强度后,加入不同刺激物,分别采用50 μmol/L的Digitonin和5 mmol/L EGTA作最大值和最小值校正。按公式计算 $[Ca^{2+}]_i$ 浓度^[8~10]。

1.5 统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差别用 t 检验判定。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 血小板源生长因子诱导平滑肌细胞迁移

血小板源生长因子BB二聚体(PDGF-BB)具有明显的诱导SMC迁移的作用,并且有量效关系(图1, Figure 1)。作用的峰值浓度为5 μg/L,随着PDGF-BB剂量增加,这种作用又趋减弱。VP在浓度低于500 nmol/L时未见诱导SMC迁移作用。

2.2 血小板源生长因子诱导平滑肌细胞迁移的可能机制

2.2.1 血小板源生长因子对细胞内游离钙离子浓度 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响 培养基中加入PDGF-BB后,SMC $[Ca^{2+}]_i$ 从 17.7 ± 6.0 nmol/L升高到 197 ± 30 nmol/L($P < 0.01$),潜伏期约为10 s,持续约2 min后回到基线,这种作用也呈量效关系。VP则诱导瞬间爆发式的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高(变化值为 749 ± 90 nmol/L, $n = 17$, $P < 0.01$),作用的峰—峰值为PDGF-BB

的 3.8 倍(图 2, Figure 2)。

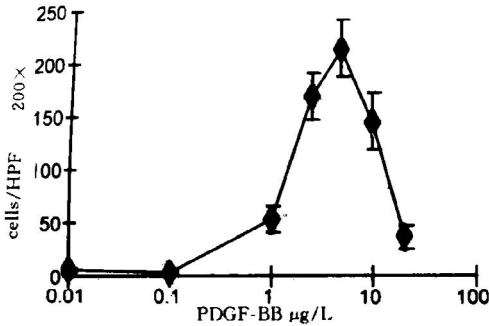


Figure 1. Chemotactic effect of PDGF-BB on migration of vascular smooth muscle cells (A7r5) in a dose dependent manner.

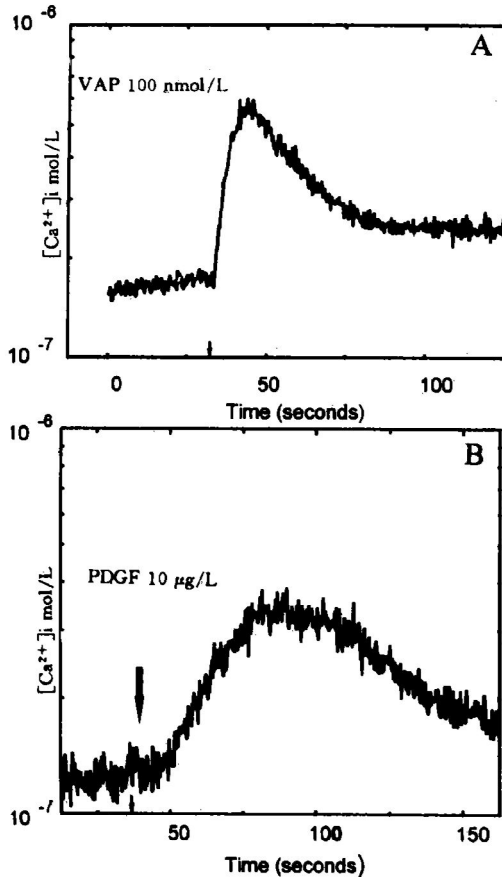


Figure 2. Representative traces of intracellular ionic calcium in response to vasopressin (A) and PDGF-BB (B) stimulation in A7r5 cell line.

2.2.2 钙离子螯合剂 BAPTA 对平滑肌细胞的作用 BAPTA 使静息状态下 SMC $[Ca^{2+}]_i$ 从 160 ± 15 nmol/L ($n=25$) 下降到 125 ± 12 nmol/L ($n=17$), 差异有显著性意义 ($P<0.05$)。100 μ mol/L 的 BAPTA 使 SMC 对 VP 和 PDGF-BB 刺激反应引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的幅度明显下降(图 3, Figure 3)。BAPTA 抑制 SMC 对 PDGF-BB 诱导的趋化性迁移。

2.2.3 Ni^{2+} 对 SMC $[Ca^{2+}]_i$ 的影响 2 mmol/L 的 Ni^{2+} 明显减弱了 SMC 对 VP 和 PDGF-BB 刺激反应引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的幅度(图 3, Figure 3)。

2.2.4 酪氨酸激酶抑制剂对 SMC 的影响

50 μ mol/L 酪氨酸激酶抑制剂 Genistein 几乎完全抑制 SMC 对 PDGF-BB 刺激反应引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的反应(图 4, Figure 4)以及抑制 SMC 对 PDGF-BB 诱导的趋化性迁移。但对 VP 诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高无抑制作用。

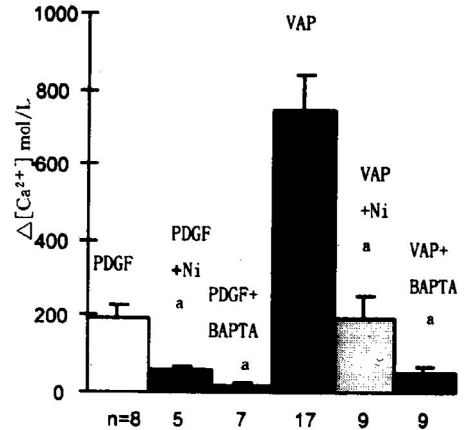


Figure 3. Effects of Ni^{2+} (2 mmol/L) and BAPTA (100 μ mol/L) on intracellular free calcium (Ca^{2+}) in response to vasopressin (100 nmol/L) and PDGF (10 μ g/L) in A7r5. a: $P<0.01$, compared with controls.

3 讨论

通过 PDGF-BB 对体外培养的 SMC 作用的研究, 结果证明了以下四个方面。① $[Ca^{2+}]_i$

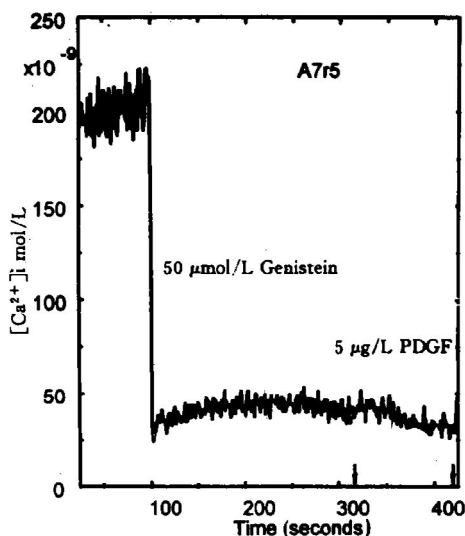


Figure 4. Effect of genistein(50 $\mu\text{mol/L}$) on intracellular free calcium in response to 5 $\mu\text{g/L}$ PDGF in A7r5.

升高是SMC对PDGF反应的早期细胞内信号传递通路之一,PDGF-BB在体外实验条件下能诱导SMC的趋化游走。VAP在体外实验条件下虽可促使 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 大幅度升高,但无诱导SMC的趋化游走作用。②VAP和PDGF-BB诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高均有细胞内钙的释放和细胞外钙离子内流两种成分,PDGF诱发的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高主要是细胞外钙离子内流的结果。③PDGF-BB介导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高为酪氨酸蛋白激酶依赖性。④SMC对PDGF-BB诱导的趋化游走作用既依赖于 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高又依赖于酪氨酸蛋白激酶的活性。

血小板源生长因子(PDGF)是*sis*原癌基因的表达产物,分子量为30 kDa,含A和B链。PDGF在正常生理情况下存在于血小板的 α 颗粒内。当血小板与凝血酶、胶原和ADP等接触时便聚集脱颗粒,将PDGF释放入血。近年来的研究表明单核巨噬细胞、内皮细胞、SMC和胚胎癌细胞等细胞都具有合成和释放PDGF的功能。PDGF不仅可以促进内皮细胞的增殖,还可以促进SMC、纤维母细胞和单核细胞的增殖,并向内膜下迁移^[3,5,9]。

迄今为止,细胞迁移的具体过程、生物学特性变化和细胞内信号传递等还不清楚。一般认为,细胞对趋化物的反应过程包括:细胞膜上的特异受体与趋化物结合后向细胞内传递信号,细胞随之发生粘附、变形、铺展、细胞骨架和肌丝收缩重排而促使细胞迁移。细胞外基质分子TSP、纤维蛋白原(fibrinogen, Fg)和Fn有类似PDGF-BB的作用,能趋化性诱导SMC游走^[2,5~7,11~13]。PDGF虽然不是细胞粘附蛋白,但有明显的促进细胞迁移的作用。本实验证明了 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高是PDGF与SMC结合后的较早细胞内信号传递通路之一。

细胞内游离 Ca^{2+} 参与细胞的兴奋、肌性细胞中肌动蛋白的收缩、细胞膜上整合素受体的循环和一些酶的活性,也是细胞生长、分裂、增殖的第二信使。本文结果显示PDGF-BB能够诱发延迟的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高。已知PDGF通过和细胞膜上的PDGF受体结合起作用,PDGF受体分为细胞内外两部分,细胞膜外部分是与PDGF结合的位点,膜内部分含有一个酪氨酸激酶,当PDGF与受体结合时,酪氨酸激酶开始自动磷酸化。本文结果显示,SMC对PDGF的反应,不象对VP那样迅速,而是有一个明显的潜伏期。说明PDGF与受体结合后,可能不是直接开启钙离子通道,而是由某些中间过程或产物介导。这种作用可被酪氨酸激酶抑制剂Genistein所抑制。因此,PDGF所诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高有酪氨酸激酶依赖性。由此推测,这一与 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高有关的过程,就是细胞内某些酪氨酸蛋白的磷酸化^[14,15]。VP引起的SMC的瞬间爆发式的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高。 Ni^{2+} 阻断细胞外 Ca^{2+} 内流。 Ni^{2+} 轻度减弱了SMC对VP刺激引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高,明显抑制PDGF-BB刺激反应引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的幅度。BAPTA是钙离子螯合剂,100 $\mu\text{mol/L}$ BAPTA使静息状态下SMC $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 明显下降,并在很大程度上抑制了SMC对VP和PDGF的反应,提示VP和PDGF诱发的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高均有细胞外钙内流和细胞内钙释放二个成分。但从SMC对二者诱发 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的反应时相、持续时间以及上升

幅度上看,VP引起的SMC $[Ca^{2+}]_i$ 浓度升高,主要是细胞内钙的释放^[8]。VP诱发的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高可能与血管的收缩作用有关;而PDGF诱发延迟性 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,除与血管收缩有关外,还可能与SMC的变形和趋化性游走有关。BAPTA和Genestein均能抑制SMC对PDGF-BB诱导的趋化性迁移,说明SMC对PDGF-BB诱导的趋化游走作用既依赖于 $[Ca^{2+}]_i$ 升高又依赖于酪氨酸蛋白激酶的活性。

参考文献

- 1 Pualetto P, Sartore S, Pessina AC. Smooth muscle cell proliferation and differentiation in neointima formation and vascular restenosis. *Clin Sci*, 1994, **87**: 467~497.
- 2 Naito M, Hayashi T, Kuzuya M, et al. Effects of fibrinogen and fibrin on the migration of vascular smooth muscle cells *in vitro*. *Atherosclerosis*, 1990, **83**: 9~14.
- 3 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis; a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801~809.
- 4 Hughes AD, Clunn GF, Refson J, et al. Platelet-derived growth factor: Action and Mechanisms in vascular smooth muscle. *Gen Pharmacol*, 1996, **27**: 1 079~089.
- 5 Abedi H, Zachary I. Signalling mechanism in the regulation of vascular cell migration. *Cardiovasc Res*, 1995, **30**: 544~556.
- 6 Xie LD, Lymn JS, Clunn GF, et al. Fibrinogen causes migration and increase intracellular Ca^{2+} in vascular smooth muscle cells via an RGD interaction. *J Hypertens*, 1996, **10**: 439.
- 7 Brown SL, Lundgren CH, Nordt T, et al. Stimulation of migration of human aortic smooth muscle cells by vitronectin; implications for atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 1994, **28**: 1 815~820.
- 8 Hughes AD, Schachter M. Multiple pathways for entry of calcium and other divalent cations in vascular smooth muscle cell line(A7r5). *Cell Calcium*, 1994, **15**: 317~330.
- 9 Hughes AD, Patel M, Wijetunge S, et al. Comparison of the effects of platelet-derived growth factor isoforms on signaling and DNA synthesis of human cultured saphenous vein cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1995, **25**: 481~485.
- 10 Gryniewicz G, poenie M, tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 1985, **260**: 3 440~450.
- 11 Clyman RI, Turner DC, Kramer RH. An alpha-1/beta-1-like integrin receptor on rat aortic smooth muscle cells mediates adhesion to laminin and collagen types I and N. *Arteriosclerosis*, 1990, **10**: 402~409.
- 12 Clyman RI, Mauray F, Kramer RH. Beta-1 and beta-3 integrins have different roles in the adhesion and migration of vascular smooth muscle cells on extracellular matrix. *Exp Cell Res*, 1992, **200**: 272~284.
- 13 Xie LD, Clunn GF, Hughes AD. Intracellular signals involved in the attachment of vascular smooth muscle cells to fibrinogen. *Hypertension*, 1996, **28**: 687.
- 14 Wijetung S, Hughes AD. pp60src increase voltage-operated calcium channel currents in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **217**: 1 039~044.

(1997-09-06收到, 1998-01-27修回)