

硝苯吡啶对血管平滑肌细胞连接通讯的影响

白雪松 楼定安 张 骅

(浙江医科大学病理学教研室, 杭州 310031)

The Effects of Nifedipine on Vascular Smooth Muscle Cell's Junctional Communication

BAI Xue-Song, LOU Din-An and ZHANG Hua

(Department of Pathology, Zhejiang Medical University Hangzhou 310031, China)

ABSTRACT

Aim In order to explain the mechanism of vascular smooth muscle cells (SMC) proliferation, we tried to find some factors positively affecting on the junctional communication and expression of connexin 43.

Methods The method called scrape loading dye-transfer was used to test effects of nifedipine on cultured rat SMC's junctional communication. We used micro-fluorescence spectrophotometer for quantitation.

On the other hand, the expression of connexin 43 in cultured SMC was determined with S-P immunohistochemistry. The quantity of expression of connexin 43 was analysed with image computer.

Results Nifedipine promoted junctional communication and expression of connexin 43 in cultured rat SMC. Phorbol ester inhibited junctional communication and expression of connexin 43.

Conclusion The possible mechanism of inhibiting proliferation of SMC and preventing atherosclerosis for nifedipine could be partly through promoting junctional communication and expression of connexin 43.

KEY WORDS Nifedipine; Junctional communication; Connexin 43; Smooth muscle cell

摘要 为了解硝苯吡啶对血管平滑肌细胞连接通讯的影响,采用荧光黄划痕示踪法,测定硝苯吡啶作用的培养的大鼠平滑肌细胞连接通讯功能,并通过显微荧

光光度计进行定量分析。此外,采用免疫组织化学 S-P 法了解硝苯吡啶对该类细胞连接蛋白 43 表达的影响,通过计算机图像分析进行定量研究。结果显示,硝苯吡啶促进细胞连接蛋白 43 的表达和细胞连接通讯。提示硝苯吡啶通过促进细胞连接蛋白 43 的表达和细胞连接通讯来抑制平滑肌细胞增殖,是抗动脉粥样硬化作用的重要机制之一。

关键词 硝苯吡啶; 连接通讯; 连接蛋白 43; 血管平滑肌细胞

细胞缝隙连接(gap junction)将信使物质在相互接触的细胞之间传递,发挥细胞增殖调控等作用,它的结构基础是连接蛋白(connexin)。文献[1~3]报道,连接蛋白 43 在早期动脉粥样硬化血管平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)上的表达远高于进展期动脉粥样硬化血管。缝隙连接通讯的抑制是促进细胞增殖的重要机制之一^[4],这预示着连接蛋白 43、连接通讯及 SMC 增殖之间存在内在联系。本文采用荧光黄染料划痕标记^[5,6]及免疫组织化学 S-P 法^[7~9]定量研究硝苯吡啶对 SMC 连接通讯的影响。

1 材料与方法

1.1 平滑肌细胞的培养与鉴定

选用新生 Wistar 大鼠(浙江医科大学动物室提供)主动脉,采用机械抓刮法分离 SMC,接种于含 10% 超级小牛血清的 DMEM 培养液中,静置于含 5% CO₂ 培养箱中培养 2 周,待细胞融合成单层后传代,本文用 5~15 代细胞。电镜下证实细胞有丰富的微丝束,免疫组织化学检测显示为肌动蛋白,光镜下细胞呈长梭形,生长呈“峰谷”样特征。

1.2 实验分组

实验分为硝苯吡啶组、佛波酯组 and 对照组。在对照

组培养液中加入 10% 超级小牛血清(杭州四季青生物研究所), 硝苯吡啶组培养液中加入 1 $\mu\text{mol/L}$ 硝苯吡啶(Sigma 公司), 佛波酯组培养液中加入 9 $\mu\text{g/L}$ 佛波酯(Sigma 公司), 均作用 3 h。

1.3 荧光黄划痕示踪法及荧光光量测定

将各组细胞分别移入 35 mm 培养皿, 经无菌 PBS 液轻洗 3 次后, 在玻片上用锋利刀片划痕 1~2 条, 再加入 0.1% 荧光黄(购自 Sigma 公司), 3 min 后洗掉染液。采用 OPTON MPMOIK 细胞分光光度计, 通过 Olympus KP490 滤光片观察黄色荧光^[10], 并记录染料传递的层次和范围。在摄影物镜 10 \times 下, 沿伤缘细胞列两侧随机取 10 μm^2 矩形光栅 10 个, 求得平均光密度值(OD)。由于荧光黄分子量仅 457.2, 可以通过接触的细胞间缝隙连接, 而不能通过正常的细胞膜, 故荧光黄从伤缘细胞进入细胞后传递的范围反映了细胞连接通讯功能^[10]。

1.4 免疫组织化学 S-P 法及定量分析

将各组细胞分别移入灭菌载玻片, 经 10% 甲醛室温下固定 10 min 后晾干, 加入非特异羊血清, 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min 后吸去多余液体, 加入兔抗连接蛋白 43 多克隆抗体 10 mg/L(美国 Zymed 实验室提供) 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h, 经 PBS 液轻洗后加入生物素化羊抗兔二抗体(福州迈新提供) 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 经 PBS 液轻洗, 加链霉菌素过氧化酶室温下 10 min, PBS 液轻洗, 加新鲜配制 DAB 液, 镜下观察 10~15 min 终止。苏木素复染, 树胶封固^[8,9]。在 MIPS 图像分析仪(OPTON MPMOIK 显微光度计改装, 物镜 16 \times) 下, 每张切片取 3 个不同视野, 随机测取 100 余个细胞光密度值, 求平均值, 并在摄影镜(40 \times) 下摄影。

1.5 统计学处理

所得数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间差异用 t 检验。

2 结果

2.1 硝苯吡啶对细胞连接通讯的影响

由表 1(Table 1)得知, 对照组血管平滑肌细胞发生荧光黄传递, 传递层次为 2~3 层, 而硝苯吡啶组培养的血管平滑肌细胞荧光黄传递层次达 4 层以上, 荧光黄强度明显高于对照组($P<0.001$)。促癌剂佛波酯的荧光黄仅停留在伤缘细胞层, 荧光黄强度明显低于对照组($P<0.001$), 说明硝苯吡啶促进细胞连接通讯, 佛波酯则为抑制作用。

Table 1. The effects of nifedipine on the junctional communication ($\bar{x}\pm s$).

Groups	n	Layers	OD
Control	41	++	0.790 \pm 0.040
Niedipine	45	+++	0.976 \pm 0.162 ^a
Phorbol ester	38	—	0.738 \pm 0.048 ^a

a : $P<0.001$, compared with control group. “—”: Lucifer Yellow limited to the primary loaded cells. “+”: Lucifer Yellow transfered one layer from the primary loaded cells to the contacted cells. “++”: Lucifer Yellow transfered two or three layers from the primary loaded cells to the contacted cells. “+++”: Lucifer Yellow transfered three or four layers from the primary loaded cells to the contacted cell. “++++”: Lucifer Yellow transfered over four layers from the primary loaded cells to the contacted cells.

2.2 硝苯吡啶对细胞连接蛋白 43 表达的影响

由表 2(Table 2)得知, 硝苯吡啶组平滑肌细胞连接蛋白 43 的表达水平明显高于对照组($P<0.001$)。从图片(Figure)上看出, 接触的细胞之间及单个细胞膜周围有较多的斑点状棕黄颗粒物, 而佛波酯组光密度值小, 细胞连接蛋白 43 的表达水平明显低于对照组($P<0.001$)。说明硝苯吡啶促进细胞连接蛋白 43 的表达, 而佛波酯抑制该蛋白的表达。在本实验所用药物浓度及作用时间下对细胞形态改变无明显差异。

Table 2. The effects of nifedipine on the expression of Connexin 43 ($\bar{x}\pm s$).

Groups	n	OD	MF
Control	131	0.178 \pm 0.035	1.530 \pm 0.260
Nifedipine	174	0.204 \pm 0.047 ^a	1.530 \pm 0.320
Phorbol ester	125	0.115 \pm 0.022 ^a	1.590 \pm 0.340

a : $P<0.001$, compared with control group. MF: morphological factor.

3 讨论

分子量低于 1.5 kDa 的物质能通过细胞缝隙连接。荧光黄作为一种分子量为 457.2 的小分子物质能通过细胞缝隙连接, 但不能透过正



Figure. The expression of connexin 43 between SMC and SMC (40 \times). A: nifedipine (10 μ mol/L), B: phorbol ester (9 mg/L).

常细胞膜^[5]。锐刀划痕后一定时间内,从受伤细胞进入的荧光黄染料向其相邻细胞传递的层次和亮度反映了细胞之间的通讯功能。从本实验的结果看出,硝苯吡啶对细胞连接通讯与连接蛋白 43 的表达的影响是一致的,即提高细胞连接蛋白 43 表达水平,促进了细胞连接通讯的功能。而佛波酯的作用与之相反。

细胞缝隙连接是输送生长调控信号的结构基础^[4,11],为动脉粥样硬化中平滑肌细胞增殖调控机制的研究提供了新的途径。佛波酯是促癌剂,本文结果表明它对细胞连接通讯及细胞连接蛋白 43 的表达均起抑制作用,是促肿瘤生长的可能机制。而硝苯吡啶的作用正好与之相反,它作为抗动脉粥样硬化性心脏病药物已经广泛应用于临床,对动脉平滑肌细胞增殖的抑制作用也得到公认。

过去认为,硝苯吡啶在 μ mol/L 浓度水平上抑制平滑肌细胞增殖,是通过减慢收缩型平滑肌细胞向合成型平滑肌细胞转型及抑制细胞起始 DNA 合成来实现的^[12]。从本实验结果看,硝

苯吡啶抑制平滑肌细胞增殖,可能是通过促进平滑肌细胞连接蛋白 43 的表达水平,增加细胞连接通讯的功能来实现的。另外还与细胞内钙离子浓度有关,细胞内钙离子在细胞生长、分化的调控中起着重要作用,细胞内钙离子含量增高可抑制细胞缝隙连接^[13]。有实验证明钙结合的钙调素可以与离体的晶体细胞(MIP 26)整合,导致 MIP26 分子构型结晶化,引起缝隙连接通道关闭^[14,15]。从本文结果推测,硝苯吡啶抑制钙离子内流,使钙结合的钙调素减少,从而促进细胞缝隙连接通道的开放。也有人认为硝苯吡啶促进细胞连接通讯与提高细胞内 cAMP 水平有关^[16]。

综上所述,平滑肌细胞连接蛋白 43 表达水平的提高与细胞连接通讯功能的增强是一致的。硝苯吡啶可能通过促进细胞连接蛋白 43 的表达、抑制钙离子内流,减少钙结合的钙调素形成,从而增强细胞连接通讯功能,抑制平滑肌细胞增殖,发挥抗动脉粥样硬化的作用。

参考文献

- 1 Chen SC, Pelletier DB, Peng AO, et al. Connexin 43 reverses the phenotype of transformed cells and alters their expression of cyclin/cyclin-dependent kinases. *Cell Growth Differ*, 1995, 6(6): 681~690.
- 2 Larson DM, Handenschild CC, Beyer EC. Gap junction messenger RNA expression by vascular wall cells. *Circ Res*, 1990, 66(4~6): 1 074~080.
- 3 Blackburn JP, Peters NS, Yeh HI, et al. Upregulation of connexin 43 gap junctions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15: 1 219~228.
- 4 Loewenstein WR. Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochem Biophys Acta*, 1979, 560: 1~65.
- 5 Stewart WW. Lucifer dyes-highly fluorescent dyes for biological tracing. *Nature*, 1981, 292(2): 17~21.
- 6 Elfouly MH, Trosko JE, Chia CC. Scrape-loading and dye transfer. *Exp Cell Res*, 1987, 168: 422~430.
- 7 Zuo RS, Itzkowitz SH, Kin YS. A comparison of three immuno peroxidase techniques for antigen detection in colorectal carcinoma tissues. *J Histochem Cytochem*, 1988, 36 (3): 317~322.
- 8 Elias JM, Michele MBS, Diane GBS. Sensitivity and detection efficiency of the peroxidase antiperoxidase (PAP), avidin-biotin peroxidase complex (ABC) and peroxidase-labeled avidin-biotin (LAB) methods. *Am J Clin Pathol*, 1989, 92: 62~67.
- 9 任占平. 应用 SP 免疫组化染色法的体会. *诊断病理学杂志*, 1994, 1(3): 176.
- 10 林仲翔, 赵雅丽, 韩亚玲, 等. 胃癌细胞与正常细胞的缝隙连接通讯和促癌剂效应的研究. *实验生物学报*, 1989, 22(2): 157~164.
- 11 Mehat PP, Bertram JS, Loewenstein WR. Growth inhibition of trans-formed cells correlates with their junctional communication with normal cells. *Cell*, 1986, 44: 187~196.
- 12 Nilsson J, Sjolund M, Palmberg L, et al. The calcium antagonist nifedipine inhibits arterial smooth muscle cell proliferation. *Atherosclerosis*, 1985, 58: 109~122.
- 13 Rose B, Simpson I, Loerenstein WR. Calcium ion produces graded changes in permeability of membrane channels in cell junction. *Nature*, 1977, 267: 625~627.
- 14 Peracchia C, Bernardini G. Gap junction structure and cell to cell coupling regulation; Is there a calmodulin involvement? *Federation Proc*, 1984, 43: 2 681~891.
- 15 Wei JWV, Morris HP, Hickie RA. Positive correlation between calmodulin cotent and hepatoma growth rates. *Cancer Res*, 1982, 42: 2 571~574.
- 16 Etingin OR, Hajjar DP. Nifedipine increase cholesterol ester hydrolytic activity in lipid-laden rabbit arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 1985, 75 (5): 1 554~558.

(1997-12-26 收到, 1998-05-10 修回)