

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2001)-05-0376-04

血小板源生长因子和血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 对血管平滑肌细胞中 p57 基因表达的影响

汪明慧, 许顶立, 刘煜, 赖文岩

(第一军医大学南方医院心血管内科, 广州 510515)

[主题词] p57; 肌, 平滑, 血管; 基因表达; 血小板源生长因子; 血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$

[摘要] 为观察血小板源生长因子 BB 和血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 对血管平滑肌细胞 p57 蛋白和基因表达的影响及其在血管平滑肌细胞增殖增生中的作用。用贴壁法培养鼠胸主动脉平滑肌细胞, 加入血小板源生长因子 BB 20 $\mu\text{g/L}$ 或血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 1 $\mu\text{mol/L}$ 刺激 24 h。用 Western 蛋白印迹法检测 p57 蛋白水平, 用 DNA 芯片技术检测 p57 mRNA 的表达量。结果发现, 血小板源生长因子 BB 刺激组 p57 mRNA 和 p57 蛋白表达量明显高于血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 刺激组, 分别为后者的 2.47 倍和 1.7 倍。而血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 刺激组 p57 蛋白表达量与对照组接近, 保持在较低水平。研究结果提示, 在血小板源生长因子刺激引起的血管平滑肌细胞增殖过程中 p57 基因表达明显增高, p57 基因的高表达可能起抑制血管平滑肌细胞过度增殖的作用。

[中图分类号] R322.121

[文献标识码] A

The Effect of Platelet Derived Growth Factor BB and Angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$ on p57 kip2 Gene Expression in Vascular Smooth Muscle Cells

WANG Ming-Hui, XU Ding-Li, LIU Yu, and LAI Wen-Yan

(Department of Cardiology, Nanfang Hospital, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

MeSH p57kip2; Gene Expression; Muscle, Smooth, Vascular; Platelet-Derived Growth Factor; Angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$

ABSTRACT **Aim** This study was to investigate p57kip2 gene expression in hyperplastic or hypertrophic vascular smooth muscle cells (VSMC) stimulated by platelet-derived growth factor (PDGF-BB) and angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$. **Methods** Rat aorta media smooth muscle cells were cultured. PDGF-BB and $\text{Ang} \text{ II}$ were added into serum-free medium at a concentration of 20 $\mu\text{g/L}$ and 1 $\mu\text{mol/L}$, respectively. VSMC were harvested after stimulated for 24 h. Protein level of p57kip2 was investigated with Western blot analysis and p57kip2 gene mRNA was determined by microarray. **Results** Both p57kip2 mRNA and protein level were higher in PDGF-BB stimulated VSMC than those in $\text{Ang} \text{ II}$ stimulated ones. The p57kip2 protein level of VSMC was similar in $\text{Ang} \text{ II}$ stimulated group as compared with serum-free control. **Conclusions** There is increased expression of p57kip2 protein during VSMC proliferation stimulated by PDGF-BB, which may prevent VSMC from overhyperplasia.

目前研究已证实, 因刺激因子不同或同一刺激因子在不同作用条件下, 血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 可出现增殖和增生两种生长方式。这两种生长方式在心血管疾病发生发展中的作用有所不同。血小板源生长因子 (platelet de-

rived growth factor, PDGF) 是强有力的内源性促有丝分裂因子, 刺激 VSMC 增殖。血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ (angiotensin, $\text{Ang} \text{ II}$) 在无血清情况下诱导 VSMC 增生。近来发现细胞周期进行的调控是决定 VSMC 增生亦或增殖的关键^[1-4]。p57 是细胞周期负性调节因子——细胞周期素依赖性激酶抑制蛋白 (cyclin-dependent kinase inhibitors, CKI) 家族的重要成员^[5], 主要参与 G1 期的调节, 在 VSMC 细胞周期调控中的作用还不清楚。本研究选择了 PDGF-BB 和 $\text{Ang} \text{ II}$ 作为刺激因子, 采用 Western 蛋白印迹法和 DNA 芯片技术分别检测增殖和增生的 VSMC 中 p57 蛋白和 p57 mRNA 表达水平的变化。

[基金项目] 国家自然科学基金 (39770325) 和国家重点基础研究发展规划基金 (G2000056905) 资助。

[作者简介] 汪明慧, 女, 1968 年 11 月出生, 汉族, 硕士, 心血管内科, 现在解放军 262 医院心血管内科任主治医师。许顶立, 男, 1962 年 5 月出生, 汉族, 主任医师, 教授, 现任第一军医大学南方医院心血管内科副主任, 本文通讯作者。联系电话: 020-85141501; 传真: 020-87705671; E-mail: dinglixu@fimmu.edu.cn。刘煜, 女, 1971 年 4 月出生, 汉族, 第一军医大学心血管内科在读硕士研究生。

1 材料与方法

1.1 材料

血管紧张素 ① (Ang ① , Sigma 公司), 血小板源生长因子 BB(PDGF-BB, Sigma 公司), DMEM (Gibco 公司), 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Hyclon 公司), 0.25% 胰蛋白酶(Hyclon 公司), 细胞裂解液(lysis buffer, NEB 公司); 抗 p57 单克隆鼠抗人抗体(一抗)由美国哈佛大学麻省总医院(MGH)病理科 Dr. Wu 惠赠; 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体(二抗)购于 Amersham 公司, ECL Western 杂交显影试剂盒(Amersham 公司), TR1zoL 试剂(Gibco 公司), RNA-free 水(Gibco 公司), DNA 芯片试剂盒(AtLASTM Human Cell Cycle Array, Clontech 公司)。

1.2 血管平滑肌细胞的培养及处理

实验所用动物为 7~8 周龄雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠(第一军医大学附属南方医院动物所), 断头处死, 无菌分离胸主动脉。贴壁法培养 VSMC。光镜和电镜下鉴定, 并用抗 α -actin 单抗鉴定 VSMC。第 4~6 代细胞用于实验。实验前 48 h 换成不含血清的 DMEM, 使细胞处于静止状态。参照文献[2, 3], 在无血清 DMEM 中加入 PDGF-BB 20 $\mu\text{g/L}$ 或 Ang ① 1 $\mu\text{mol/L}$ 继续培养。Western 杂交实验中以静止的和 10% FBS 刺激的 VSMC 分别作为静止和增殖对照, 刺激 24 h。

1.3 细胞生长率的测定

培养的 4~6 代 VSMC 用胰酶消化后, 接种于 6 孔板上。细胞贴壁后, 静止 48 h, 按实验设计依次加入刺激因子。24 h 后, 消化, 计数细胞, 重复 3~5 次, 取均值。

1.4 血管平滑肌细胞蛋白含量测定

用细胞裂解液裂解细胞, 离心后吸取上清液用于实验。用考马斯亮蓝 G-250 染色法, 检测样本蛋白含量。

1.5 Western 印迹分析法

取样本总蛋白 30 μg 进行变性 SDS/10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后电转移于 PVDF 膜上(Millipore 公司), 应用 TBS-T (pH 7.5) 缓冲液(20 mmol/L Tris-base, 137 mmol/L NaCl, 0.1% Tween-20)配制的 5% 无脂牛奶封闭 PVDF 膜, 过夜。漂洗后, PVDF 膜在室温下与抗 p57 单克隆抗体(一抗)孵育 90 min, 再与羊抗鼠 IgG 二抗(1:1 000 稀释, Amersham 公司)孵育 1 h; 然后采用 ECL(Amersham 公司)试剂盒显影。预先显色的蛋白标记物(GIBCO 公司)用以显示蛋白质质量。每一步实验至少重复三次。

1.6 DNA 芯片检测技术

按照说明书进行操作。简言之, 用 TR1zoL 试剂提取 VSMC 中的 RNA, 用 DNA 酶纯化总 RNA。用 DNA 芯片试剂盒进行 32P 同位素标记探针, 纯化探针。将膜作好标记, 放入 0.5% SDS 中煮沸 2 min, 洗膜, 将膜放入杂交炉中, 68 $^{\circ}\text{C}$ 预杂交 30 min。将标记的探针 200 μL 加 22 μL 10 \times 变性液 68 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min; 之后将其加入到 Cot-1 DNA 5 μL 与 2 \times 中性液 225 μL 混合的液体中, 68 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min。将上述液体加入杂交瓶中 68 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 3 h。洗膜后, X 光片在 -70 $^{\circ}\text{C}$ 曝光 3~6 h、24 h、72 h、7 天及 1 月。选择基因点最多的 X 光片分析。

1.7 统计学处理

实验结果用光密度扫描仪扫描, 面积 \times 密度代表表达量。在 Western 杂交实验中, 以对照组表达量均值为 100%, 其它各组值与对照组表达量的均值比较, 得出相对光密度值(OD), 用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。DNA 芯片实验中, 选择两个刺激组间表达量接近的看家基因做基准, 取其光密度均值作标准, 其它组值与标准光密度值比较得出相对 OD 值。我们选择的看家基因为 GAPDH。实验组间统计学差异显著性用方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 表示统计学上有差异。

2 结果

2.1 血小板源生长因子 BB 和血管紧张素 ① 刺激 24 h 对血管平滑肌细胞数目及蛋白量的影响

血小板源生长因子(PDGF) BB 刺激组 VSMC 数目明显增加, 为 Ang ① 组的 1.83 倍, 为对照组的 1.94 倍($P < 0.01$), 蛋白含量与对照组相近($P > 0.05$); 而 Ang ① 组 VSMC 数目与对照组接近($P > 0.05$), 但蛋白含量较对照组高 83.05% ($P < 0.01$) (表 1, Table 1)。

2.2 血小板源生长因子 BB 和血管紧张素 ① 刺激 24 h p57 蛋白表达量的变化

血小板源生长因子(PDGF) BB 刺激组光密度值为 1.6408 ± 0.3424 , Ang ① 刺激组光密度值为 0.9667 ± 0.1166 , 10% FBS 刺激的增殖对照组光密度值为 1.3940 ± 0.2137 , 对照组光密度值为 1.000 ± 0.0164 。PDGF-BB 刺激组光密度值高于对照组, 为对照组的 1.64 倍, 两组比较差异在统计学上有非常显著性意义($P < 0.01, n = 3$); PDGF-BB 刺激组光密度较 Ang ① 刺激组增加 69.7%, 两组比较差异在统计学上有非常显著性意义($P < 0.01, n = 3$)。Ang ① 刺激组光



图 1. 血小板源生长因子 BB 和血管紧张素 Ⅱ刺激 24 h p57 蛋白表达量的变化

Figure 1. Effect of PDGF and Ang Ⅱ on p57kip2 protein expression in vascular smooth muscle cell. Lane 1: 10% FBS; Lane 2: PDGF-BB 20 μ g/L; Lane 3: Ang Ⅱ 1 μ mol/L; Lane 4: Serum free; M: Marker.



图 2. 血小板源生长因子 BB 或血管紧张素 Ⅱ刺激 24 h p57 mRNA 的变化

Figure 2. p57kip2 gene mRNA expression in vascular smooth muscle cells stimulated by PDGF or Ang II.

表 1. 血小板源生长因子 BB 和血管紧张素 Ⅱ刺激 24 h 血管平滑肌细胞数目及蛋白量的变化

Table 1. Effects of PDGF-BB and Ang Ⅱ on VSMC's growth and protein content ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Groups	Numbers of cell ($\times 10^9/L$)	Protein content (ng/cell)
Control	5.01 ± 0.03	0.59 ± 0.22
Ang Ⅱ	5.31 ± 0.02	1.08 ± 0.18^b
PDGF-BB	9.73 ± 0.09^b	0.62 ± 0.27
10% FBS	8.83 ± 0.07^b	0.64 ± 0.19

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

密度值与对照组光密度值接近($P > 0.05$, $n = 3$) (图 1, Figure 1)。

2.3 血小板源生长因子和血管紧张素 Ⅱ刺激血管平滑肌细胞 24 h p57 mRNA 的表达

应用美国 Clontech 公司提供的 DNA 芯片试剂盒 (Atlas™ Human Cell Cycle Array) 检测, PDGF-BB 刺激组 p57 mRNA 相对光密度值为 4.4852, Ang Ⅱ组为 1.8197, 前者明显高于后者, 为后者的 2.47 倍 (图 2, Figure 2)。

3 讨论

血小板源生长因子 (PDGF) BB 为强有丝分裂

原, 刺激 VSMC 后, 使其细胞数目明显增加, 但不影响蛋白含量; Ang Ⅱ刺激无血清培养的 VSMC 仅诱导其增生, 使 VSMC 蛋白含量增加, 但不增加细胞数目。是较好的研究 VSMC 增殖增生信号传导差异的细胞模型^[1-4]。我们已经报道在血管平滑肌细胞和心肌细胞中 Cyclins 的表达增加与细胞能否进入细胞周期并不完全一致。p27 蛋白的表达量决定 VSMC 和 CM 能否通过限制点, 是细胞增殖抑或增生传导路的关键因子^[2,3]。p57 蛋白和 p27 蛋白相类似, 都是 CKIs 的 Kip 家族成员^[5-8]。文献报道, p57 主要作用于 G1 晚期, 对作用于 G1/S 转变期的 cyclin/Cdks 复合物有较强的抑制作用, 从而使细胞增殖停滞于 G1 期^[5,7]。目前对 p57 在细胞增殖及组织发育中的作用研究, 多集中在肿瘤及发育异常性疾病上^[8,9]。p57 在 VSMC 增殖中的作用还未见报道。

本实验选择了 PDGF-BB 和 Ang Ⅱ作为 VSMC 增殖和增生的刺激因子, 研究了 p57 在 VSMC 增殖增生中的作用。与对照组比较, PDGF-BB 刺激 24 h, p57 蛋白表达量明显增加, Ang Ⅱ刺激组 VSMC 中 p57 蛋白表达量与对照组接近, 维持在较低水平。p57 mRNA 表达量与其蛋白改变的趋势一致。这一结果提示在 VSMC 增殖过程中出现的高表达量的 p57, 其作用可能为抑制 VSMC 过度增殖, 防止因 G1 期调节失控导致 VSMC 异常增殖, 有着重要的生理意义。总之, 与在肿瘤细胞的研究结果不同, 本研究

结果提示在 PDGF 刺激引起的 VSMC 增殖过程中 p57 基因表达是明显增高的。p57 基因的高表达可能起抑制 VSMC 的过度增殖的作用。

参考文献

- [1] Gibbon GH, Pratt RE, Dzau VJ. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs hyperplasia [J]. *J Clin Invest*, 1992, **90**: 456-461
- [2] 许顶立, 袁勇, 刘伊丽, 等. 血管紧张素 E 和血小板源生长因子对血管平滑肌和心肌细胞细胞周期素及 p27 蛋白的不同影响[J]. *中华医学杂志*, 1999, **79**: 657-660
- [3] 袁勇, 许顶立, 刘伊丽, 等. 血管平滑肌细胞增殖与 Cdk 抑制蛋白 p27 的表达[J]. *生理学报*, 1999, **51**: 285-290
- [4] Brauer-Dullaues RC, Michael JM, Ziegler A, et al. A new role for the cyclin dependent kinase inhibitors p27Kip1 in angiotensin E stimulated vascular smooth muscle cell hypertrophy [J]. *J Clin Invest*, 1999, **104**: 815-823
- [5] Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, et al. p57kip2, a structurally distinct member of the p21Cip1 Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene[J]. *Genes Dev*, 1995, **9**: 650-662
- [6] Matsuoka S, Thompson JS, Edwards JM, et al. Imprinting of the gene encoding a human cyclin dependent kinase inhibitor, p57Kip2, on chromosome 11p15 [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, **93**: 3 026-030
- [7] Lee MH, Reynisdottir I, Massague J. Cloning of p57Kip2, a cyclin dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution [J]. *Genes Dev*, 1995, **9**: 639-649
- [8] Yan Y, Frisen J, Lee MH, et al. Ablation of the Cdk inhibitor p57kip2 results in increased apoptosis and delayed differentiation during mouse development [J]. *Genes Dev*, 1997, **11**: 973-983
- [9] Zhang P, Liegeois N, Wong C, et al. Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57Kip2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome [J]. *Nature*, 1997, **387**: 151-158

(此文 2001-02-19 收到, 2001-09-28 修回)

(此文编辑 胡必利)

•会议征文•

全国第二届临床心脑血管病学术会议征文通知

由中国药理学会和中华医学会青岛分会联合主办的“全国第二届临床心脑血管病学术会议”定于 2002 年 5 月在昆明或西安召开, 现将会议征文有关事项通知如下:

1、征文内容: 心脑血管疾病的基础与应用基础研究; 心脑血管疾病的临床研究; 心脑血管药理的基础与应用基础研究; 心脑血管疾病药物治疗学研究; 心脑血管疾病介入治疗学研究; 心脑血管疾病护理; 临床研究方案的设计与统计方法研究等。

2、论文撰写要求: 所投论文必须是未公开发表的学术论文, 或具有本人研究工作的综述。声明无一稿多投, 文稿首页加盖单位公章, 文责自负。参照《中国临床药理学与治疗学》杂志论文格式要求撰写, 中英文摘要按结构式书写。来稿最好打印或通过 E-mail 投稿。每篇论文需交审稿费 30 元。

3、论文截稿日期: 2002 年 3 月 30 日。

4、入选论文将以全文、摘要形式分期刊登于《中国临床药理学与治疗学》杂志(CN34-1206/R, ISSN 1009-2501)和《青岛医药卫生》杂志(CN37-1249/R, ISSN 1006-5571)

5、来稿请寄: 安徽省芜湖市皖南医学院弋矶山医院内《中国临床药理学与治疗学》杂志编辑部收, 邮政编码 241001, 信封上请注明“心脑血管病学术会议”。

6、联系电话: 0553-5738856-2333, 0553-5738350。E-mail: editors@ mail. ahwhptt. net. cn

中国药理学会
中华医学会青岛分会
2001 年 9 月 8 日