

[文章编号] 1007-3949(2003)11-06-0523-03

•实验研究•

血小板源生长因子 BB 对人血管平滑肌细胞钙调素的影响

黄 佐, 任雨笙, 杜荣增, 潘晓明, 樊 民, 吴宗贵

(第二军医大学长征医院心血管内科, 上海市 200003)

[关键词] 细胞生物学; 血小板源生长因子对细胞内钙调素的影响; 细胞培养; 血小板源生长因子 BB; 平滑肌细胞; 钙调素; 细胞周期

[摘要] 为研究血小板源生长因子 BB 对培养的人血管平滑肌细胞钙调素的影响, 采用培养的人血管平滑肌细胞, 应用磷酸二酯酶法观察不同浓度的血小板源生长因子 BB 对钙调素含量变化的影响及其时间效应。结果发现, 平滑肌细胞在进入细胞增殖周期后, 细胞内钙调素含量逐渐增加, 在 9 h 时出现一个短暂的高峰, 随后细胞内钙调素含量逐渐下降。血小板源生长因子 BB 可促进钙调素含量的增加, 并呈现出明显的浓度依赖关系, 30 $\mu\text{g/L}$ 血小板源生长因子 BB 作用最为显著。结果提示, 血小板源生长因子 BB 可明显促进培养的人血管平滑肌细胞钙调素含量的增加, 并存在着一定的量效依赖关系及时间反应性。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

Effects of Platelet-Derived Growth Factor BB on Content of Calmodulin in Cultured Human Vascular Smooth Muscle Cells

HUANG Zuo, REN Yu-Sheng, DU Rong-Zeng, PAN Xiao-Ming, FAN Min, and WU Zong-Gui

(Department of Cardiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[KEY WORDS] Platelet-Derived Growth Factor-BB; Smooth Muscle Cell; Calmodulin; Cell Cycle; Cell Culture

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) on content of calmodulin in human vascular smooth muscle cells. **Methods** The human vascular smooth muscle cells were cultured and effects of PDGF-BB on content of calmodulin in human vascular smooth muscle cells were assayed at different time and different concentration by its ability to stimulating calmodulin dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase in vitro. **Results** Calmodulin level of quiescent human vascular smooth muscle cells was increased in its cell cycles with a maximal response 9 h, and PDGF-BB could significantly increase content of calmodulin of human vascular smooth muscle cells in a dose-dependent manner, with a maximal response at a concentration of 30 $\mu\text{g/L}$. **Conclusion** PDGF-BB could significantly increase calmodulin level of quiescent human vascular smooth muscle cells in a dose-dependent manner.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 是构成血管壁的主要细胞成份之一, 在血管的动脉粥样硬化病变中, 增殖的 VSMC 是粥样斑块中重要的成分之一。钙调素 (calmodulin, CaM) 是真核细胞中普遍存在的钙受体蛋白, 涉及多种信号途径的传导, 在细胞增殖周期中起着重要的调节作用, 影响着细胞的增殖及分化^[1]。血小板源生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 是体内一种较强的促有丝分裂剂和化学诱导剂, 可刺激某些组织细

胞的分裂、增殖, 与机体组织的生长发育、创伤愈合、动脉粥样硬化以及肿瘤的发生、发展有密切的关系^[2,3]。本实验采用培养的人血管平滑肌细胞 (human vascular smooth muscle cell, hVSMC), 观察 PDGF-BB 对 hVSMC 钙调素含量变化的影响, 以了解 PDGF-BB 对 hVSMC 在细胞增殖分化周期中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

血小板源生长因子 BB 和木牛脑钙调素 (Sigma 公司)。DMEM 细胞培养基 (Gibco 公司)。胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (杭州四季青生物制品厂)。胰蛋白酶 (Gibco 公司进口分装)。YJ-875 超净工作台 (苏州市净化设备公司)。LS6500 型液体闪烁计数器 (Beckman 公司)。多头细胞样品收集仪 (浙江绍兴东浦医疗仪器厂)。Shell-Lab2323 型 CO₂ 孵

[收稿日期] 2003-04-25 [修回日期] 2003-08-01

[基金项目] 上海市科技发展基金 (014119072) 资助

[作者简介] 黄佐, 男, 汉族, 1958 年 4 月出生, 江苏省启东市人, 医学博士, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病介入诊断与治疗 and 人工心脏起搏治疗工作。E-mail: huangzub@yahoo.cn.com。任雨笙, 男, 汉族, 1963 年 6 月出生, 浙江省东阳市人, 医学博士, 副主任医师, 副教授, 主要从事冠心病的基础研究和临床工作。吴宗贵, 男, 汉族, 1953 年 5 月出生, 安徽省枞阳市人, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事高脂血症、高血压、冠心病的基础研究和临床工作。

箱(美国 Sheldon MFG 公司)。

1.2 细胞培养

在无茵条件下,取人肠系膜下动脉,采用组织块法行中层 hVSMC 培养,时差法除去杂细胞;待 hVSMC 长成峰、谷交错的致密细胞层后,进行传代培养,第 3~8 代用于实验。将贴壁生长的 hVSMC 用 0.25% 胰蛋白酶消化后,用 10% FBS-DMEM 调整细胞数为 10^8 个/L,接种于培养瓶中,放入 CO_2 培养箱中孵育 24 h,镜下观察细胞贴壁生长情况。

1.3 实验分组及钙调素含量的测定

将贴壁生长的 hVSMC 弃去原培养基,用 DMEM 培养基洗涤细胞 3 次,换用 0.5% 灭活 FBS-DMEM 培养基继续培养 24 h,使细胞同步于 G_0/G_1 期^[4]。浓度效应组加入 1% 灭活 FBS-DMEM 培养基,同时加入不同浓度的 PDGF-BB,使其终浓度分别为 1 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 、30 $\mu\text{g/L}$ 及 40 $\mu\text{g/L}$,培养 9 h。时间效应组加入 30 $\mu\text{g/L}$ PDGF-BB 的 1% 灭活 FBS-DMEM 培养基,分别培养 6 h、9 h、12 h 及 15 h。以 1% 灭活 FBS-DMEM 培养基作为空白对照组。将收集的 hVSMC 放入苯甲磺酰氨缓冲液中,用超声细胞粉碎仪破膜,2 500 \times g 离心 5 min,取上清,100 $^\circ\text{C}$ 水浴 5 min,冻干备用。磷酸二酯酶法^[5]测定其对磷酸二酯酶的激活能力,由钙调素标准品作标准激活曲线,计算待测样品的钙调素含量。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 软件包对数据进行统计学处理,两组间总体均数的比较采用 t 检验,多组间总体均数的比较采用方差分析。

2 结果

2.1 不同浓度的血小板源生长因子 BB 对人血管平滑肌细胞处理后钙调素含量的影响

随着 PDGF-BB 浓度的增高,hVSMC 中的钙调素含量逐渐增高。1 $\mu\text{g/L}$ 的 PDGF-BB 对 hVSMC 中的钙调素无明显作用,10 $\mu\text{g/L}$ 时钙调素含量显著增加,30 $\mu\text{g/L}$ 时钙调素含量的增加更为明显($P < 0.01$),见(表 1, Table 1)。

2.2 血小板源生长因子 BB 对人血管平滑肌细胞作用不同时间点钙调素含量的变化

对照组随着 hVSMC 同步地进入细胞增殖周期,细胞内钙调素含量也开始增加,在 9 h 时出现一个短暂的高峰,随后细胞内钙调素含量逐渐下降,但高于 6 h 时的钙调素水平。30 $\mu\text{g/L}$ PDGF-BB 可明显促进 hVSMC 中钙调素含量的增加,表现出与对照组相

似的变化,且显著高于对照组(表 2, Table 2)。

表 1. 不同浓度的血小板源生长因子 BB 对人血管平滑肌细胞钙调素含量的影响

Table 1. Effect of PDGF-BB on content of calmodulin of hVSMC at different concentration ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	钙调素含量 (ng/10 ⁴ 细胞)
对照组	23.59 \pm 0.68
PDGF-BB	
1 $\mu\text{g/L}$	24.67 \pm 0.85
10 $\mu\text{g/L}$	29.28 \pm 0.40 ^a
20 $\mu\text{g/L}$	30.54 \pm 0.29 ^a
30 $\mu\text{g/L}$	31.17 \pm 0.52 ^a
40 $\mu\text{g/L}$	30.28 \pm 0.45 ^a

a: $P < 0.01$, 与 1 $\mu\text{g/L}$ PDGF-BB 组比较。

表 2. 血小板源生长因子 BB 对人血管平滑肌细胞钙调素含量变化的时间效应

Table 2. Effect of PDGF-BB on content of calmodulin of hVSMC at different time ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$, ng/10⁴ 细胞)

时间	对照组	PDGF-BB 组
6 h	13.13 \pm 0.57	16.34 \pm 0.31 ^a
9 h	23.59 \pm 0.68	33.82 \pm 0.45 ^b
12 h	17.51 \pm 0.49	25.29 \pm 0.64 ^b
15 h	15.22 \pm 0.47	19.71 \pm 0.83 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组相比。

3 讨论

血管平滑肌细胞是血管壁的重要组成细胞,在动脉粥样硬化的形成和发展过程中,平滑肌细胞的增殖与分化在其发展过程中起着重要的作用。血小板源生长因子是一个极强的促有丝分裂素,在细胞的增殖和转化,组织损伤的修复以及动脉粥样硬化的形成中均起重要的作用。本实验采用细胞培养的方法,除在体内情况下神经、体液及代谢等方面的影响外,观察血小板源生长因子 BB 对 h 血管平滑肌细胞钙调素含量的影响。为了较精确的观察 h 血管平滑肌细胞在细胞周期中钙调素含量的变化,实验在加入血小板源生长因子 BB 前,用 0.5% 灭活 FBS-DMEM 培养细胞 24 h,使细胞生长周期同步于 G_0/G_1 期^[4]。实验结果显示,在 h 血管平滑肌细胞的增殖周期中,钙调素含量增加,在 G_1 晚期达到高峰,随后细胞内钙调素含量又略有下降,血小板源生长因子 BB 可增加 h 血管平滑肌细胞内的钙调素含量,且呈现出一定的量效关系。钙调素是一种钙受体蛋白,它参与细胞中信号的传导,调节细胞内

Ca²⁺ 的浓度以及许多酶的活性。钙调素水平的变化与细胞增殖有密切的关系^[1,6], 它可直接影响细胞周期的进程。钙调素含量的增加缩短了 G₁ 时期程, 使细胞增殖加速, 如果细胞内钙调素水平一过性降低, 则可引起细胞周期的短暂停滞。钙调素在血管平滑肌细胞收缩的调节中起着十分重要的作用, 血管平滑肌细胞与心肌、骨骼肌不同, 它不是以肌钙蛋白细胞作为钙受体, 而是以钙调素或 Leiotonin 作为受体, 介导 Ca²⁺ 对许多细胞功能的调节。Ca²⁺ 与钙调素结合形成复合物后, 可直接激活肌动蛋白使血管平滑肌细胞收缩^[1]。此外钙调素还调节细胞 c-fos 和 c-myc 的表达以及 cAMP 的代谢。我们的其他研究证实血管平滑肌细胞为血小板源生长因子的靶细胞, 其细胞膜上存在血小板源生长因子的受体, 在有增殖和动脉粥样硬化斑块的血管平滑肌细胞上血小板源生长因子受体表达明显增加, 血小板源生长因子可促进血管平滑肌细胞的增殖及胶原的合成, 并有明显的量效依赖关系及不同的反应时间性^[7,8]。血小板源生长因子促使细胞内钙调素含量的增加可能与血管平滑肌细胞的增殖以及血管平滑肌细胞收

缩促进血管痉挛有一定的关系, 至于钙调素在促进细胞增殖和血管平滑肌细胞收缩的作用机制还需要进一步研究。

[参考文献]

- [1] Rasmussen CD, Lu KP, Means RL, Means AR. Calmodulin and cell cycle control. *J Physiol Paris*, 1992, **86** (1): 83-88
- [2] Inoue K, Cynshi O, Kawabe Y, Nakamura M, Miyauchi K, Kimura T, et al. Effect of BO-653 and probucol on c-myc and PDGF-A messenger RNA of the iliac artery after balloon denudation in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, 2002, **161** (2): 353-363
- [3] 杨国君, 张琪, 丁金凤. 动脉壁正常区与脂斑区血小板源性生长因子及其受体基因表达的比较. *中国动脉硬化杂志*, 1995, **3** (4): 283-286
- [4] Kuga T, Kobayashi S, Hirakawa Y, Kanaide H, Takeshita A. Cell cycle-dependent expression of L- and T-type Ca²⁺ currents in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Circ Res*, 1996, **79** (1): 14-19
- [5] 丁文勇, 赵宝昌, 韩旭. 钙调素的内核苷磷酸二酯酶检测法. *大连医科大学学报*, 1999, **21** (1): 3-6
- [6] 符民桂, 唐朝枢. 钙调神经磷酸酶活性测定. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (1): 82-83
- [7] 任雨笙, 陈强, 贾国良, 金岩, 董绍忠. 血小板衍化生长因子β受体在人冠状动脉组织中的表达. *第四军医大学学报*, 1998, **19** (6): 652-654
- [8] 任雨笙, 崔芳, 贾国良, 俞世强, 汤朝武, 吴宗贵. 血小板衍化生长因子对血管平滑肌细胞增殖及胶原蛋白合成的影响. *心脏杂志*, 2001, **13** (2): 90-93

(此文编辑 文玉珊)