

水蛭素对凝血酶诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响

王敏¹, 崔连群¹, 张承俊², 王晓军¹, 烟玉琴³, 秦凤菊³

(1. 山东大学临床医学院省立医院, 山东省济南市 250021; 2. 济南市第一人民医院, 山东省济南市 250012; 3. 山东科技大学生物医学系, 山东省济南市 250031)

[关键词] 药理学; 水蛭素对血管平滑肌细胞的作用; 免疫组织化学染色与流式细胞术; 凝血酶; 水蛭素; 血管平滑肌细胞; 动脉粥样硬化

[摘要] 为研究重组水蛭素对凝血酶诱导的兔胸主动脉血管平滑肌细胞增殖的影响及其作用机制。选用第 2~5 代培养的血管平滑肌细胞, 在与凝血酶(4.0 ku/L)共同孵育的条件下, 分别给予水蛭素(6.0 ku/L)和肝素(6.0 ku/L)进行干预。通过四唑盐比色实验检测细胞生长活性, 流式细胞术检测细胞周期, 免疫组织化学检测血小板生长因子和增殖细胞核抗原在血管平滑肌细胞中的表达。结果发现, 重组水蛭素能明显抑制凝血酶诱导的平滑肌细胞增殖, 其抑制作用可能与减低了血管平滑肌细胞对血小板生长因子和增殖细胞核抗原的表达有关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Influence of Hirudin on Thrombin-induced Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells

WANG Min, CUI Lian-Qun, ZHANG Ceng-Jun, WANG Xiao-Jun, YAN Yu-Qin, and QIN Feng-Ju

(Department of Cardiology, Shandong Provincial Hospital, the Clinical Medical College of Shandong University, Jinan, Shandong 250021, China)

[KEY WORDS] Thrombin; Hirudin; Vascular Smooth Muscle Cell; Atherosclerosis; Immunohistochemistry Technique; Proliferating Cell Nuclear Antigen

[ABSTRACT] **Aim** To study the influence of hirudin on thrombin-induced proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) and its regulated mechanism in vitro. **Methods** VSMCs were isolated from the thoracic aorta of rabbits and cultured 2~5 passages were incubated with thrombin (4.0 ku/L), while hirudin (6.0 ku/L) and heparin (6.0 ku/L) were added except for control group. The effect of hirudin on growth of VSMC was determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and flow cytometry. The expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in VSMCs was evaluated by immunohistochemistry technique and computer image analysis system.

Results Hirudin remarkably inhibited both the thrombin-induced proliferation and the expression of PDGF and PCNA in VSMC ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Hirudin is able to significantly influence the proliferative activity of VSMCs, which may be carried out through inhibition of PDGF and PCNA expression.

动脉受损时, 正常情况下静止的中层血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)增殖并迁移至内膜合成细胞外基质, 这是导致动脉粥样硬化及介入治疗后再狭窄形成的重要原因, 因此抑制平滑肌细胞生长是治疗动脉粥样硬化及再狭窄的重要手段之一。动脉受损处凝血酶的产生不仅参与凝血过程, 而且参与动脉粥样硬化斑块及再狭窄形成的过程。本研究用体外细胞培养的方法证明, 凝血酶是促进 VSMC 增殖的重要因子, 水蛭素(hirudin)可

显著抑制凝血酶诱导的 VSMC 增殖, 这为探索以 VSMC 增殖为特征的心血管病的发病机制及治疗提供了的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

凝血酶, 胰蛋白酶, DMEM 培养基, 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑盐[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT], 碘化丙啉(propidium iodide, PI)购自 Sigma 公司; 重组水蛭素由山东阿华生物药物有限公司馈赠; 胎牛血清, 杭州四季青公司生产; 平滑肌肌动蛋白(α -actin)、血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)单克隆抗体和 SABA 试剂盒购自武汉博士德公司。超净工作台(JHT 型)、CO₂ 培养箱(Nuare

[收稿日期] 2003-04-10

[修回日期] 2003-10-20

[作者简介] 王敏, 女, 1959 年出生, 山东省泰安市人, 副教授, 医学博士, 从事心血管病临床工作, 研究方向是冠心病及再狭窄机理, 现工作单位是山东科技大学生物医学系, 电话: 0531-5903198, 0531-5903366, E-mail: Wangm@ustd.edu.cn。崔连群, 男, 1957 年出生, 山东省青州市人, 医学博士, 教授, 博士研究生导师, 从事心血管病临床工作, 研究方向是冠心病介入及再狭窄机理。张承俊, 男, 1962 年出生, 山东省淄博市人, 医学博士, 副主任医师, 从事心血管病临床工作, 研究方向是冠心病介入及再狭窄机理。

型)、倒置相差显微镜(Olympus型)、流式细胞仪(ELITE ESP型)、酶联免疫检测仪(BIORAD 550型)。

1.2 血管平滑肌细胞的体外培养

血管平滑肌细胞培养参照文献[1,2]。取10周左右家兔,耳缘静脉注气处死。在严格无菌条件下取出兔主动脉,用D-Hanks液将血凝块清洗干净后将主动脉纵向剖开,去除动脉外膜和内膜。然后将动脉中层平滑肌切成表面积为 $1 \times 1 \text{ mm}^2$ 的小块,种植在培养瓶中,用含20%胎牛血清的DMEM培养基,在 37°C 、5% CO_2 条件下进行培养。0.25%胰酶消化传代,2~5代平滑肌细胞用于实验。平滑肌细胞台盼蓝染色,活细胞数在98%以上。平滑肌细胞的鉴定采用抗平滑肌特异 α -肌动蛋白(α -actin)免疫组织化学染色阳性,以及形态学典型的“峰和谷”样生长状态判定。

1.3 噻唑蓝法检测细胞增殖

将第2代VSMC稀释至 5×10^7 个细胞/L,接种于96孔板($100 \mu\text{L}$ /孔),培养8 h后培养板内有80%的细胞呈汇合状态,换无血清DMEM同步24 h[同步是指在无血清培养条件下,24 h后所培养细胞趋于处在同一增殖周期(G_0 、 G_1 、S、 G_2 、M)]。实验分4组(每组8孔):凝血酶(4.0 ku/L)组;凝血酶(4.0 ku/L) + 水蛭素(6.0 ku/L)组;凝血酶(4.0 ku/L) + 肝素(6.0 ku/L)组;无血清DMEM培养基为空白对照组。每组实验重复6次。各组分别培养6、12、24、48 h后分别每孔加入MTT溶液(5 g/L)20 μL ,继续培养4 h,小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入150 μL 二甲亚砜,在微孔振荡器上振荡10 min,使结晶物充分溶解。选择570 nm波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度(absorbance, A)值,记录结果。

1.4 流式细胞仪分析细胞生长周期的变化

用流式细胞仪检测细胞各周期的细胞数及总细胞数的百分比。用75 mL培养瓶培养生长情况基本相同的5~8代平滑肌细胞,培养至已有80%的细胞呈汇合状态时,换无血清DMEM同步24 h。实验分4组:凝血酶(4.0 ku/L)组;凝血酶(4.0 ku/L) + 水蛭素(6.0 ku/L)组;凝血酶(4.0 ku/L) + 肝素(6.0 ku/L)组;无血清DMEM培养基为空白对照组。继续培养24 h后消化细胞,进行以下操作:用0.25%的胰蛋白酶消化细胞,每个样品每次检测10 000个细胞,重复3次。加PBS洗涤2次,800~1 000 r/min离心5 min,弃上清,加入 4°C 予冷的PBS 1 mL,将细胞用加样器吹匀,再加入无水乙醇2 mL,立即振荡混匀,固定30 min,置 4°C 冰箱保存待检。检测前离心弃上清,用碘化丙啶染色30 min。经筛网过滤除去

成团细胞后,用流式细胞仪检测细胞周期。检测结果用美国Phoenix公司的Multicycle软件进行分析。

1.5 免疫细胞化学法检测血小板生长因子和增殖细胞核抗原

用免疫组织化学SABC法。选用生长良好的第4至第5代VSMC,用培养基调整细胞密度为 2×10^7 个/L,接种在6孔培养板内的盖玻片上,置培养箱中培养,待细胞生长成片状时,换无血清DMEM同步24 h。实验分4组(每组8片):凝血酶(4.0 ku/L)组;凝血酶(4.0 ku/L) + 水蛭素(6.0 ku/L)组;凝血酶(4.0 ku/L) + 肝素(6.0 ku/L)组;无血清DMEM培养基为空白对照组。各组分别培养4、24 h后取出盖片,用D-Hanks液洗去培养基,普通滤纸吸去盖片上的液体,置于冷丙酮中固定20 min,吹干。将盖片固定在洁净的载玻片上,加含0.5% H_2O_2 的甲醇,室温30 min以灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水洗涤;再滴加正常山羊血清封闭液,室温孵育10 min,弃血清,分别滴加兔抗PDGF或小鼠抗PCNA单克隆抗体,实验片滴加抗PDGF或PCNA血清(1:80),阴性对照片滴加PBS, 4°C 过夜。PBS洗3次,每次5 min;分别滴加生物素化鼠抗兔IgG, 37°C 下作用30 min, PBS洗,滴加SABC(链霉亲和素—生物素—过氧化物酶复合物), 37°C 下作用30 min, PBS冲洗;联苯二胺显色,约5 min,镜下观察PDGF阳性细胞浆染成棕黄色,PCNA阳性细胞核染成棕黄色,阴性细胞核为无色;用蒸馏水洗涤,脱水、透明、封片、照相。用计算机图像分析系统随机测量10个高倍视野中PDGF及PCNA阳性细胞数、吸光度及SMC总数,求出PDGF及PCNA表达的阳性细胞百分率和平均吸光度值。

1.6 统计学处理

测定结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SAS软件系统分别进行基本统计量计算,用方差分析,组间两两比较用 q 检验。

2 结果

2.1 凝血酶和水蛭素对血管平滑肌细胞增殖的影响

噻唑蓝法检测证实,凝血酶的促血管平滑肌细胞增殖的作用从6 h出现,表现为MTT值的升高,24 h达高峰。重组水蛭素、肝素均可以有效地阻断凝血酶作用,但水蛭素较肝素作用强,维持时间长(表1, Table 1)。

表 1. 噻唑蓝法检测凝血酶和水蛭素对血管平滑肌细胞增殖的影响

Table 1. MTT colorimetric assay of the cell proliferation in different groups at different time ($\bar{A}$, $\bar{x} \pm s$)

分 组	n	吸光度值(A)			
		6 h	12 h	24 h	48 h
对照组	6	1.179 ± 0.03	1.202 ± 0.03	1.189 ± 0.04	1.191 ± 0.01
凝血酶组	6	1.213 ± 0.01	1.328 ± 0.04 ^a	1.501 ± 0.05 ^b	1.303 ± 0.04 ^a
凝血酶 + 水蛭素组	6	1.199 ± 0.02	1.201 ± 0.06 ^c	1.204 ± 0.05 ^d	1.139 ± 0.05 ^d
凝血酶 + 肝素组	6	1.232 ± 0.04	1.287 ± 0.03 ^c	1.419 ± 0.07 ^c	1.334 ± 0.04

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, 与凝血酶组比较。

2.2 凝血酶和水蛭素对血管平滑肌细胞各个周期的影响

用流式细胞仪检测细胞各周期的时相分布显示,凝血酶使停留于静止期(G_0)/DNA 合成前期(G_1 期)的细胞数减少,而进入 DNA 合成期(S 期)及 DNA 合成后期(G_2 期)/有丝分裂期(M 期)细胞数明显增多($P < 0.05$),提示凝血酶促进 VSMC 增殖,而加水蛭素、肝素后均可以逆转凝血酶的作用($P < 0.05$)(表 2, Table 2)。

表 2. 流式细胞仪分析各组血管平滑肌细胞周期

Table 2. Flow cytometry assay of the cell staging in different groups (% , $\bar{x} \pm s$)

分 组	n	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
对照组	3	62.28 ± 0.81	27.50 ± 1.56	10.22 ± 1.59
凝血酶组	3	44.83 ± 0.67 ^a	39.29 ± 0.84 ^a	15.88 ± 0.17 ^a
凝血酶 + 水蛭素组	3	63.52 ± 0.77 ^b	26.54 ± 0.61 ^b	9.94 ± 0.98 ^b
凝血酶 + 肝素组	3	61.51 ± 0.53 ^b	25.39 ± 1.99 ^b	13.10 ± 1.98 ^b

a: $P < 0.05$, 与对照组比较; b: $P < 0.05$, 与凝血酶组比较。

2.3 凝血酶、水蛭素对血管平滑肌细胞表达血小板生长因子和增殖细胞核抗原的影响

免疫组织化学染色显示, VSMC 与不同组孵育 4 h 后,凝血酶组 PDGF 阳性细胞数量和吸光度明显高于对照组($P < 0.01$),而 PCNA 变化不明显;24 h 后,凝血酶组 PCNA 阳性细胞数量和吸光度明显高于对照组($P < 0.01$),此时 PDGF 较对照组无显著变化。加入水蛭素可显著减低 PDGF 和 PCNA 阳性细胞数量和吸光度($P < 0.05 \sim P < 0.01$)(表 3, Table 3)。

3 讨论

伴随着血管的损伤,凝血系统激活,凝血酶不但参与凝血过程形成血栓,还通过其特异性的受体引

起 VSMC 增殖。在正常的动脉管壁,凝血酶受体仅在血管内皮细胞层少量表达;而动脉粥样硬化斑块和球囊损伤后的管壁,凝血酶受体在内皮细胞、平滑肌细胞、巨噬细胞等广泛表达,因而在冠状动脉斑块及再狭窄的形成中起重要作用^[3]。水蛭素是作用最强的特异性凝血酶抑制剂,它与凝血酶以等摩尔比形成非共价键紧密结合的稳定复合物(其解离常数 $K = 2.3 \times 10^{-14} \text{ mol/L}$),从而使凝血酶失活。1955 年, Markwardt^[4] 首先从医用水蛭(hirudomedicinalis)中成功分离出天然水蛭素,但由于资源有限,使水蛭素的进一步研究与临床应用都受到限制。直到上世纪八十年代随着分子生物学与基因工程技术的发展,开始采用 DNA 重组技术生产重组水蛭素,使其开发利用得以发展。后来的研究发现,水蛭素除了具有抗凝作用外,还能有效地抑制血管损伤模型内膜增厚^[5,6],因而倍受关注。

本实验用 MTT 比色法检测细胞,流式细胞仪检测细胞各周期的时相分布及免疫组织化学法检测 VSMC 表达 PDGF 及 PCNA。显示重组水蛭素能明显抑制凝血酶诱导的 VSMC 增殖,而且较肝素作用强,持续时间长。推测水蛭素抑制 VSMC 增殖作用机制可能与减低了 PDGF、PCNA 在 VSMC 表达有关。

噻唑蓝比色试验是一种检测细胞存活和生长的方法。MTT 是一种淡黄色唑氮盐,是活细胞线粒体脱氢酶的底物,经酶催化还原为不溶于水的蓝紫色甲臍(formazan)结晶,该物质溶解后,在 560 ~ 610 nm 中有一个较宽的最大吸收峰,用分光分析仪可对其进行测量,其值与活细胞之间有良好的线性关系,可间接反映细胞 DNA 合成水平。实验结果显示,加入水蛭素组 MTT 值明显较凝血酶组减低($P < 0.05 \sim P < 0.01$),间接反映了水蛭素使细胞 DNA 合成减少、增殖减低的作用。

细胞周期对细胞生命活动至关重要,调节着细胞的增殖、分化和凋亡。细胞周期不同时相中存在

表 3. 免疫组织化学染色评价各组对血小板生长因子和增殖细胞核抗原的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3. Immunohistochemical technique assay of the cellular expression of PDGF and PCNA in different groups

分 组	血小板生长因子(4 h)		增殖细胞核抗原(24 h)	
	阳性细胞数	吸光度	阳性细胞数	吸光度
对照组	22.72 ± 2.34	0.197 ± 0.080	43.11 ± 3.88	0.313 ± 0.102
凝血酶组	41.01 ± 2.56 ^a	0.326 ± 0.210 ^a	68.24 ± 2.96 ^b	0.533 ± 0.089 ^b
凝血酶 + 水蛭素组	26.34 ± 3.06 ^c	0.201 ± 0.450 ^c	44.53 ± 2.03 ^d	0.332 ± 0.057 ^d
凝血酶 + 肝素组	28.44 ± 2.09 ^c	0.224 ± 0.870 ^c	51.93 ± 1.93 ^c	0.441 ± 0.323 ^c

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, 与凝血酶组比较。

着关键的调控点,细胞在该点对复杂的细胞内外进行整合、传递,以决定细胞是否继续增殖或进入静止状态。一个限制点在 DNA 合成开始(即 $G_1 \sim S$ 限制点),另一个在有丝分裂开始(即 $G_2 \sim M$ 限制点)。而以 G_1 期和 S 期之间的限制点最为重要^[7]。本实验用流式细胞仪检测细胞各周期的时相分布显示,凝血酶使 G_0/G_1 期的细胞数减少,而进入 S 期、 G_2/M 期细胞数明显增多($P < 0.05$),而水蛭素可以逆转这种凝血酶引起的 $G_1 \sim S$ 期变化的作用($P < 0.05$),进而阻止 VSMC 由静止期进入合成期和有丝分裂期。

增殖细胞核抗原又称细胞周期蛋白(cyclin),是一种核内蛋白质,它的表达与细胞增殖有关。它是 DNA 多聚酶 δ 的一个辅助亚单位,在细胞分裂时协助 DNA 引导链和随从链的合成。PCNA 的含量在细胞周期的 G_1 期开始增加,S 期达到高峰, G_2 、M 期降低, G_0 期不能测到;其量的变化与 DNA 合成一致,是细胞周期 $G_1 \sim S$ 通路的调控蛋白,对细胞增殖的调控起关键作用^[8]。因此,检测 PCNA 是评价细胞增殖状态的可靠指标。本研究采用免疫组织化学技术观察水蛭素对凝血酶诱导体外培养的血管平滑肌细胞增殖时的 PCNA 表达的影响,结果与上述细胞周期变化一致。这种作用可能是在多种细胞内信息传递环节的参与下,最终通过 PCNA 调控 DNA 多聚酶的活性来实现的。

血小板源生长因子是重要的细胞生长因子之

一,是原癌基因 c-sis 的表达产物,被认为是一种重要的细胞信息传递物质。当 PDGF 与 VSMC 上的相应受体结合后,活化酪氨酸蛋白激酶,进而活化磷脂酰肌醇代谢途径,从而活化蛋白激酶,使细胞内钙增加;升高的钙离子浓度可以激活癌基因 c-myc、c-fos、c-myb,使这些促增殖基因开放,最终导致 VSMC 增殖。实验结果证明水蛭素抑制 PDGF 的表达。推测水蛭素抑制 VSMC 增殖,部分原因可能是抑制了 VSMC 内自分泌和/或旁分泌生长因子所致。更确切的机制将有待于进一步的研究。

[参考文献]

- [1] 梁若斯,刘建康,胡必利. 神经肽 Y 影响人血管平滑肌细胞低密度脂蛋白受体表达. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (4): 295-298
- [2] 梁朝霞,高沁怡,裴著果. 洛伐他汀对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶 3 表达的影响. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11 (4): 339-341
- [3] Wilcox JN, Rodriguez J, Subramanian R. Characterization of thrombin receptor expression during vascular lesion formation. Circ Res, 1994, 75 (5): 1 029-038
- [4] Markwardt F. Die antagonistische wirkung des hirudins gegen thrombin in vivo. Naturwissen, 1956, 43(1): 111-114
- [5] Anders Lundell, Andrew B Kelly, Johanna Anderson, Monique Marjanowski, Jeffrey J Rade, Stephen R Hanson, et al. Harker reduction in vascular lesion formation by hirudin secreted from retrovirus-transduced confluent endothelial cell on vascular in bacons. Circulation, 1999, 100 (11): 2 018-024
- [6] Eckhard Alt, Iris Haehnel, Christine Beilharz, Klaus Priezel, Daniel Preter, Agel Stemberger, et al. Inhibition of neointima formation after experimental coronary artery stenting. Circulation, 2000, 101 (5): 1 553-559
- [7] Braum-Dullaues RC, Mann MJ, Dzau VJ. Cell cycle progress; new therapeutic target for vascular proliferatin disease. Circulation, 1998, 98 (1): 82-89
- [8] Yasui H, Sakurai H. Chemiluminescent dedection and imagingnog reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. Bioche Res Commun, 2000, 291 (1): 131-139

(此文编辑 曾学清)