

生物机械力诱导蛋白激酶 C β 活化 促进血管平滑肌细胞增殖

李朝红^{1,2}, 谢富康¹, 徐清波²

(1. 中山大学基础医学院组织胚胎学教研室, 广东省广州市 510089; 2. Institute for Biomedical Aging Research, Austrian Academy of Sciences, Innsbruck, A-6020, Austria)

[关键词] 病理学与病理生理学; 高血压; 生物机械力; 血管平滑肌; 细胞增殖; 信号转导

[摘要] 目的 高血压引起的血管重塑与生物机械力的异常增加有关。为了探讨细胞外生物机械力是如何被细胞感受并被转导为细胞内的生物化学信号、最终导致细胞的病理生理反应。方法 被分离的大鼠主动脉血管平滑肌细胞种植在底部为橡胶薄膜的细胞培养板上进行体外培养, 细胞达 80% 融合后给予生物机械力刺激不同时间 (60/min, 15% 伸张度)。受刺激后的细胞被收集后通过蛋白印迹 (Western blot) 方法进行蛋白激酶 C β 在细胞内转膜和蛋白激酶 C β 蛋白磷酸化分析。此外, 受刺激后的细胞用氘标胸腺嘧啶核苷酸标记 6 h 并进行同位素计数。结果 平滑肌细胞在静息状态下蛋白激酶 C β 在胞浆和胞膜的分布各占 50%, 受机械力刺激后蛋白激酶 C β 在胞浆和胞膜的分布为 20% 和 80%, 呈现出了机械力诱导的蛋白激酶 C β 明显地由胞浆向胞膜转位。蛋白激酶 C β 磷酸化分析显示: 平滑肌细胞受机械力刺激后蛋白激酶 C β 能快速磷酸化, 并呈现明显的时间依赖性。蛋白激酶 C β 磷酸化在受机械力刺激后 2 min 时达峰值, 随后逐渐减弱, 而未受机械力刺激的细胞则没有蛋白激酶 C β 磷酸化发生。氘标胸腺嘧啶核苷酸掺入实验结果发现, 机械力刺激可明显促进细胞 DNA 合成增加。结论 生物机械力可快速激活细胞蛋白激酶 C β , 导致蛋白激酶 C β 在细胞内转位和磷酸化, 最终引起血管平滑肌细胞增殖。该研究对于理解高血压及其相关的心脑血管疾病发生的分子机制和提供对该疾病的防治方法将是非常有用的。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Biomechanical Stretch Stress Induces Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation via Protein Kinase C β Activation

LI Chao-Hong^{1,2}, XIE Fu-Kang¹, and XU Qing-Bo²

(1. Department of Histology & Embryology, Zhongshan University, School of Basic Medical Sciences, Guangzhou 510080, China; 2. Institute for Biomedical Aging Research, Austrian Academy of Sciences, Innsbruck, A-6020, Austria.)

[KEY WORDS] Hypertension; Vascular Smooth Muscle; Cell Proliferation; Signal Transduction

[ABSTRACT] **Aim** Hypertension induced cardiovascular remodeling is associated with abnormally increased biomechanical stress. To explore how the cardiovascular cells sense and convert the extracellular mechanical stress into intracellular biochemical signals leading to finally pathophysiological responses. **Methods** When rat vascular smooth muscle cells cultivated on a flexible membrane were subjected to cyclic strain stress (60 cycles/min, 15% elongation) at various time points, translocation and phosphorylation of protein kinase C (PKC) β were observed as detected by Western blot analysis. In addition, the stretched vascular smooth muscle cells were labeled using ^3H -thymidine for 6h and then harvested for ^3H -thymidine-labeled cell count. **Results** Equal distribution of PKC β was observed in cytosole and membrane of the quiescent vascular smooth muscle cells, respectively. While vascular smooth muscle cells were subjected to mechanical stress, induction of translocation of PKC β was observed as distributed by 20.9% in the cytosole and 79.1% in the membrane, implying that mechanical stress induced PKC β translocation from cytosole to membrane. Concomitantly, mechanical forces evoked rapid activation of PKC β in a time dependent manner showing that phosphorylation of PKC β peaked at 2min and declined after then in response to mechanical stress, while no phosphorylation of PKC β occurred in the untreated cells. In addition, mechanical forces significantly induced increase of DNA synthesis of vascular smooth muscle cells as demonstrated by incorporation of [^3H]-thymidine compared to no treated cells. **Conclusion** Mechanical stress significantly induced translocation and phosphorylation of PKC β in the vascular smooth muscle cells leading to increased vascular smooth muscle cell proliferation. This data will be useful for understanding the molecular mechanisms of hypertension and its related cardiovascular diseases, and providing approaches of prevention and treatment of this disease.

[收稿日期] 2005-07-26

[修回日期] 2005-09-19

[基金项目] 中山大学留学回国人员科研启动基金(1130001)和中山大学基础医学院留学回国人员科研启动基金(20041130-100)资助

[作者简介] 李朝红, 副教授, 硕士研究生导师, 1997 年 7 月毕业于中山医科大学 (现中山大学医学院), 获医学博士学位; 1998 年 5 月~2000 年 7 月在奥地利科学院老年病研究所从事博士后研究, 主要从事生物机械力 (高血压) 与血管重塑机制的研究。2001 年 1 月作为高级科学家应邀去美国宾州州立大学进行学术研究。对高血压与心脏重塑机制进行了深入探讨。2004 年 11 月回国工作; 联系电话 020-87331447, 传真 020-87331451, E-mail 为 lichaozhongzq@yahoo.com。谢富康, 教授, 博士研究生导师, 专门从事组织工程和神经发育生物学研究。徐清波, 教授, 博士研究生导师, 专门从事心血管疾病的病理学分子机制研究。

生长因子、细胞因子、渗透休克(osmotic shock)及机械力牵拉(mechanical stretch stress)等作用于细胞产生的细胞内信号常涉及一个或多个磷酸化级联(cascades)反应,导致一系列的蛋白激酶快速而可逆的激活,其中包括蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)家族^[1-6]。PKC是一个含丝氨酸-苏氨酸残基的激酶大家族。根据结构不同将PKC分为三类:经典的(α 、 β 和 γ)、新型的(δ 、 ϵ 、 η 和 θ)和非典型的(ζ 和 ι/λ)等。该家族成员可被神经递质、激素、生长因子以及不同环境应急等激活,并由此介导一系列生理反应,如细胞分化、迁移、增殖、凋亡、分泌和收缩等^[3-8]。因此,激活或抑制PKC活性成为防治心血管、神经、代谢以及免疫紊乱等疾病的重要策略。正常血压产生的生物机械力对于促进细胞分化、胚胎发育和维持细胞正常表型是必需的^[1]。然而,异常的血压升高所致的机械力改变与血管重塑密切相关,包括血管平滑肌细胞(VSMC)迁移、增殖及其功能上的改变等。已知VSMC迁移、增殖在动脉粥样硬化发生发展过程中起重要作用^[9,10]。我们已经报道了机械力刺激体外培养的VSMC可使细胞内蛋白激酶C β 激活,从而导致VSMC迁移增加^[3]。但是,我们不清楚是否有PKC家族的其它人员也参与了对机械力信号的传导。本研究中我们观察了机械力是否可引起PKC β 的活化以及PKC β 的活化在介导机械力信号引起VSMC增殖过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和机械力牵拉

方法见文献[2,3]。无菌条件下分离Wistar大鼠的主动脉,去内膜和外膜,将中膜平滑肌组织剪碎,用2.5 mL 20% FCS DMEM培养液一同种植到25 mL的培养瓶中。静置于37℃、5% CO₂培养箱中培养。30 d细胞达融合时,用0.2%胰蛋白酶和0.02% EDTA溶液消化后,弃细胞,留组织块继续培养,待细胞融合后传代。实验用第3代至第10代细胞。

细胞种植在底部为弹性合成树脂的细胞培养板上,细胞达80%融合时,无血清培养细胞72 h后给予机械力牵拉(60次/min, 15%伸张度)。牵拉仪由电脑、电脑控制的真空泵以及支持细胞培养板的基板组成(Flexcell 4000)。真空泵(15~20 kPa)重复产生负压牵拉细胞,模拟血压对血管壁细胞的作用。产生负压的幅度和时间由电脑控制。

1.2 细胞处理和蛋白抽提

参考文献[2,3]。受机械力牵拉后的VSMC用

PBS(4℃)洗2次,然后根据不同实验目的分别对细胞采取不同处理。(1)进行蛋白磷酸化检测时,收集的细胞用细胞裂解液A(略)破碎,低温高速离心,将上清液移至另一新的离心管作为全细胞蛋白。(2)用于分离膜蛋白和胞浆蛋白的细胞收集后使用细胞匀浆溶液(略)破碎细胞,低温高速离心后的上清液移至另一新的离心管作为胞浆蛋白,而离心后的不溶物沉淀加入细胞裂解液A(略),并重悬不溶物沉淀,低温高速离心后将上清液移至另一新的离心管作为细胞膜蛋白。所有以上提取的蛋白均用Bio-Rad Assay试剂盒测定。每个定量后的样本取50 μ g蛋白质热变性后加入到8% SDS-PAGE胶每一样品孔,电泳后电转移到硝酸纤维素膜上,加入一定量脱脂牛奶封闭后分别用抗磷酸化PKC β 一抗(New England Biolab)和二抗作用。特殊的抗原抗体复合物用ECL Western Blot Detection Kit(Amersham Pharmacia Biotech)检测。同一膜用洗脱液(略)洗去已检测过的一抗、二抗,然后用抗par-PKC β 抗体(Sigma, St. Louis, MO)检测PKC β 表达作为细胞内对照,以作校准加载蛋白样品量用。冲洗后的胶片用激光密度扫描仪扫描后,用专用密度分析软件进行半定量分析。根据两种抗体所得比率确定机械力对VSMC的PKC β 影响。

1.3 细胞增殖分析——氚标胸腺嘧啶核苷酸掺入

参照文献[2,9]。处于静止期的VSMC用机械力牵拉处理24 h后加入氚标胸腺嘧啶核苷酸(³H-TdR)再标记6 h。胰酶处理后的VSMC被收集到滤膜上并洗去未标记的³H-TdR,干膜后加入液闪剂用同位素记数仪记数。根据cpm值的改变确定机械力对VSMC增殖的影响。

1.4 实验分组及数据统计

实验分为阴性对照组(静息细胞或无机械力处理的细胞)和实验组(机械力处理的细胞)。根据不同要求将实验组再分为不同时间组。每次实验每组设3孔,实验重复3次。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均值用ANOVA检验,两组之间均值用student's t检验。 $P < 0.05$ 被认为差别有显著性。

2 结果

2.1 生物机械力引起血管平滑肌细胞的蛋白激酶C β 由胞浆向胞膜转位

细胞在受到外来刺激物作用后胞内多数蛋白质或酶发生转位,这种现象被认为是蛋白质被激活了的重要标志。本研究中,VSMC受机械力作用后,细

胞膜蛋白和胞浆蛋白分别被分离, 然后进行蛋白印迹检测(Western blot)。结果发现: 机械力刺激可明显地引起 PKC β 由胞浆向胞膜转位(图 1 和表 1, Figure 1 and Table 1)。未受机械力作用的阴性对照组细胞, PKC β 均匀分布于胞浆和胞膜, 而受机械力作用后仅 2 min, 大量胞浆 PKC β 转位到了胞膜。该结果说明了机械力刺激可快速地促使 PKC β 由胞浆向胞膜转位。

表 1. 蛋白激酶 C β 在血管平滑肌细胞中分布的光密度值
Table 1. OD value of PKC beta distribution in VSMC

机械力刺激时间	n	细胞浆	细胞膜
0 min	9	51.3% \pm 0.8%	48.7% \pm 1.3%
2 min	9	20.9% \pm 0.7%	79.1% \pm 0.9% ^a

a: 细胞浆与细胞膜 OD 值比较(时间为 2 min), $P < 0.01$

2.2 生物机械力引起血管平滑肌细胞蛋白激酶 C β 的磷酸化

培养的 VSMC 给予机械力刺激, 然后, 对细胞的 PKC β 磷酸化进行检测, 结果见图 2 和表 2(Figure 2 and Table 2)。机械力可明显地引起 PKC β 的磷酸化。静息培养的条件下, 细胞内的 PKC β 完全处于无磷酸化状态。一旦受机械力刺激后, PKC β 快速磷酸化, 2 min 达顶峰, 随后磷酸化逐渐减弱, 到 90 min 时, PKC β 无磷酸化状态仍然未能恢复到基线水平。该结果提示了 PKC β 参与了机械力信号的

传导。

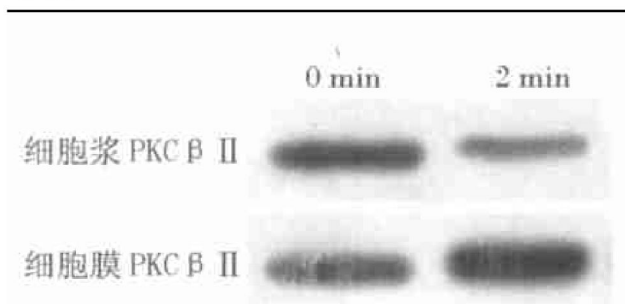


图 1. 机械力刺激对血管平滑肌细胞中的蛋白激酶 C β 转位的影响 图示为 3 次实验中的一次。

Figure 1. Effects of mechanical stress on the translocation of PKC beta in VSMCs. The figure represents the result of one of three individual experiments.

表 2. 机械力刺激对血管平滑肌细胞蛋白激酶 C β 磷酸化的影响

Table 2. Effects of mechanical stress on PKC beta phosphorylation in VSMCs

机械力牵拉时间	n	PKC β 磷酸化比率
0 min	9	0.1 \pm 0.0
2 min	9	1.2 \pm 0.3 ^b
5 min	9	0.7 \pm 0.2 ^b
30 min	9	0.3 \pm 0.1 ^a
90 min	9	0.2 \pm 0.1 ^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组(时间为 0)比较

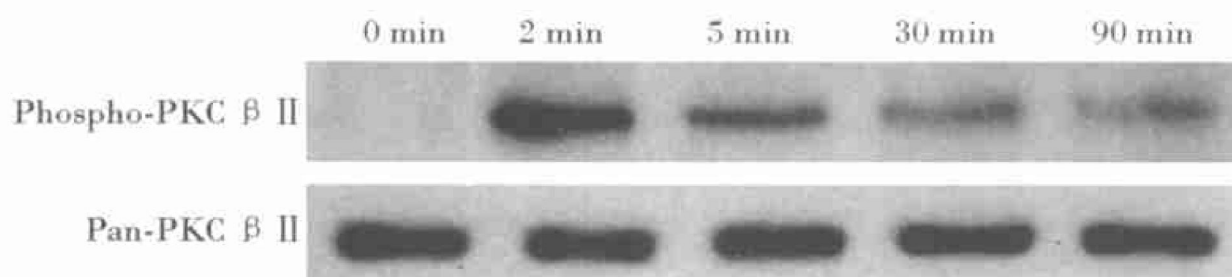


图 2. 机械力刺激对血管平滑肌细胞中的蛋白激酶 C β 磷酸化的影响 图示为 3 次实验中的一次。

Figure 2. Effects of mechanical stress on the phosphorylation of PKC beta in VSMCs. The figure represents the result of one of three individual experiments.

2.3 生物机械力引起的血管平滑肌细胞增殖

用³H-TdR 掺入法检测了细胞的 DNA 合成的结果见表 3(Table 3)。机械力可明显地引起 VSMC 增殖。同未受机械刺激组相比, VSMC 受机械力刺激后细胞内 DNA 合成增加了 4 倍。结果提示了 PKC β 可能部分地参与了机械力引起的 VSMC 增殖的信号传导。

表 3. 机械力刺激对血管平滑肌细胞 DNA 合成的影响

Table 3. Effects of mechanical stress on VSMC DNA synthesis

分 组	n	计数/ min \cdot g
对照组	9	205 \pm 25
机械力刺激组	9	937 \pm 62 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; 对照组为无机械力刺激。

3 讨论

高血压及相关的心脑血管重塑所致的心脑血管疾病是目前临床死亡的主要原因之一。研究表明高血压引起的心脑血管重塑与异常增加的生物机械力有关^[1,9]。然而,目前不清楚血管壁细胞是如何感受并将细胞外机械力信号转导入细胞内并转换成生物化学反应的。本研究用细胞生物学、生物化学和信号转导等研究技术,对受机械力刺激的VSMC蛋白激酶C β 活性及细胞增殖的影响进行了观察。结果发现了机械力可明显地促进VSMC蛋白激酶C β 磷酸化和转位,同时可引起VSMC增殖。从目前所掌握的国内外文献中还未见有相关报道。本研究意义如下:①阐明生物机械力作用的分子机制。由于高血压引起的血管重塑与异常增加的生物机械力有关,是动脉硬化的重要危险因子。因此,阐明了机械力的作用机制将有助于对高血压致病机制的理解;②阐明了蛋白激酶C β 在介导机械力信号中的作用。PKC包括了多种不同的异构酶,它们分别在细胞迁移、分化、增殖、收缩、分泌和凋亡过程中起重要作用。用分子生物学、细胞生物学和细胞信号转导等技术,解析单一PKC的不同的病理生理作用,对于高血压病的防治和新药的研发具有重要意义。

已有文献报道蛋白激酶C β 在介导细胞增殖中的作用。在啮齿类和人类的结肠癌中,蛋白激酶C β 表达和活性均明显地比正常结肠组织高^[6]。蛋白激酶C β 过度表达的转基因动物中,特别易患发结肠癌^[7]。这些研究报道说明了蛋白激酶C β 的表达和活性增强与细胞增殖有关。在我们的研究中发现,机械力可明显引起蛋白激酶C β 的磷酸化和转位,同时可有细胞的DNA合成的明显增加。尽管从仅有的实验结果我们仍不能断定机械力激活蛋白激酶C β 是否直接导致了VSMC的增殖,但从其它的关于蛋白激酶C β 的激活与细胞增殖作用的研究结果中,至少可以提示蛋白激酶C β 部分地参与了机械力对细胞增殖的调控。我们已经报道了机械力可经PGDFR(-ras/rac-MAPK通路引起细胞增殖^[2]以及蛋白激酶C β -整合素通路引起细胞迁移^[3]等重

要信号通路,本研究中我们又发现了蛋白激酶C β 也参与了介导机械力作用的信号转导。因此,更多的机械力信号通路的阐明将对于更好地理解机械力的致病作用意义重大。

血液在血管里流动主要产生两种机械力,即:血流剪切力(shear stress)和血管扩张力(stretch stress)^[1]。正常的血压产生的机械力对于促进细胞分化、胚胎发育和维持细胞正常表型是必需的。然而,异常的血压升高所致的机械力改变与血管重塑有关。因此,高血压也是动脉硬化的重要危险因子之一。临床资料表明,血压升高的水平与临床死亡率成正比。降血压治疗可以防治高血压及相关的心脑血管疾病已成共识。研究机械力作用机制对于理解如何防治高血压病及为寻找新药作用靶点提供重要的实验依据。

[参考文献]

- [1] Li C, Xu Q. Mechanical stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal*, 2000, **12** (7): 435-445
- [2] Li C, Hu Y, Mayr M, Xu Q. Cyclic strain stress-induced mitogen-activated protein kinase(MAPK) phosphatase 1 expression in vascular smooth muscle cells is regulated by Ras/Rac-MAPK pathways. *J Biol Chem*, 1999, **274** (36): 25 273-280
- [3] Li C, Wernig F, Leitges M, Hu Y, Xu Q. Mechanical stress-activated PKC δ regulates smooth muscle cell migration. *FASEB J*, 2003, **17** (14): 2 106-108
- [4] Blobel GC, Stribling S, Obeid LM, Hannun YA. Protein kinase C isoenzymes: regulation and function. *Cancer Surv*, 1996, **27**: 213-248
- [5] Takei T, Han O, Ikeda, M, Male P, Mills I, Sumpio BE. Cyclic strain stimulates isoform-specific PKC activation and translocation in cultured human keratinocytes. *J Cell Biochem*, 1997, **67** (3): 327-337
- [6] Murray NR, Weems C, Chen L, Leon J, Yu W, Davidson LA, et al. Protein kinase C beta and TGFbeta R in omega-3 fatty acid-mediated inhibition of colon carcinogenesis. *J Cell Biol*, 2002, **157** (6): 915-920
- [7] Suzuma K, Takahara N, Suzuma I, Isshiki K, Ueki K, Leitges M, et al. Characterization of protein kinase C beta isoform's action on retinoblastoma protein phosphorylation, vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell proliferation, and retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (2): 721-726
- [8] Zampetaki A, Zhang Z, Hu Y, Xu Q. Biomechanical stress induces IL-6 expression in smooth muscle cells via Ras/Rac1-p38 MAPK-NF kappa B signaling pathways. *Am J Physiol*, 2005, **288** (6): H2 946-954
- [9] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362** (6423): 801-809
- [10] 李朝红, 邓漪平, 尹小川, 刘青, 刘素红. 反义ras寡聚脱氧核苷酸对血管平滑肌细胞生物学行为的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1997, **5** (3): 217-221

(此文编辑 胡必利)