

[文章编号] 1007-3949(2006)14-09-0763-04

•实验研究•

G 蛋白抑制肽对血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响

程轶群, 李晓辉, 张海港

(中国人民解放军第三军医大学基础医学部, 重庆市 400038)

[关键词] 药理学; G 蛋白抑制肽; 细胞培养; 血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$; G 蛋白; 血管平滑肌细胞; 增殖

[摘要] 目的 观察 G 蛋白抑制肽对血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响。方法 贴块法行大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞分离培养, $\alpha\text{-SM-actin}$ 免疫细胞化学染色鉴定。以血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 为刺激因子, 并加入不同浓度的 G 蛋白抑制肽 27, 分别利用 MTT 法、Bradford 法和直接计数法检测细胞增殖活性、细胞总蛋白含量、细胞数量的变化。结果 血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 组血管平滑肌细胞增殖活性(吸光度)、细胞总蛋白含量和细胞数量明显高于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而加入浓度 $\geq 10 \mu\text{g/L}$ 的 G 蛋白抑制肽 27 后, 血管平滑肌细胞增殖活性、细胞总蛋白含量和细胞数量均较血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 组明显降低, 差异有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ 对血管平滑肌细胞的促增殖作用能被 G 蛋白抑制肽 27 所拮抗。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Effect of G Protein Inhibitory Polypeptide on the Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation Stimulated by Angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$ in Rat

CHENG Yi-Qun, LI Xiao-Hui, and ZHANG Hai-Gang

(Faculty of Basic Medicine, Third Military Medical University of Chinese People's Liberation Army, Chongqing 400038, China)

[KEY WORDS] G Protein Inhibitory Polypeptide; Cell Culture; Angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$; G-Protein; Vascular Smooth Muscle Cell; Proliferation

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effects of G protein inhibitory polypeptide (GCIP) on the proliferation of rat vascular smooth muscle cells (VSMC) promoted by angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$ in vitro. **Methods** VSMC were isolated from the media of rat's thoracic aorta obtained by explanted method, and identified by immunocytochemistry assay ($\alpha\text{-SM-actin}$). The experiment was carried out with the $\text{Ang} \text{ II}$ to induce cell proliferation, and the GCIP-27 of different density was joined at the same time, then MTT assay, Bradford method and cells count were utilized to test the proliferation and the level of vascular smooth muscle cell protein. **Results** Compared with the control group, the VSMC proliferation activity, protein level, and cell sum (by number) were obviously increased in $\text{Ang} \text{ II}$ group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Meanwhile, GCIP-27 ($\geq 10 \mu\text{g/L}$) markedly inhibited the proliferation activity, protein level, and cell sum with a significant difference from $\text{Ang} \text{ II}$ group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

Conclusions GCIP-27 could inhibit proliferation of VSMC induced by $\text{Ang} \text{ II}$.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的异常增殖是许多血管增殖性疾病如高血压、冠状动脉硬化性心脏病、血管成形术后再狭窄的共同病理基础^[1]。抑制 VSMC 异常增殖是治疗血管增生性疾病的根本途径, 而 G 蛋白在信号传导过程中起“分子开关”作用。研究显示, 血管紧张素 $\text{Ang} \text{ II}$ (angiotensin $\text{Ang} \text{ II}$) 等细胞外血管活性多肽、生长因子及细胞因子均通过作用于 VSMC 细胞膜上的相应受体, 并通过信号转换器 G 蛋白的信号转导, 最

终调控 VSMC 的舒缩、合成、分泌、分化、迁移和增殖等功能。本实验室既往工作中针对 G 蛋白 α 亚单位的功能结构域, 克隆了一种 G 蛋白抑制肽 (G protein inhibitory peptide, GCIP)^[2], 并对其基因及蛋白结构进行了分子优化, 优筛并合成了 GCIP-27。已有的研究显示, GCIP-27 对心肌重构有明显作用; 本研究则主要研究 GCIP-27 对 $\text{Ang} \text{ II}$ 诱导的大鼠 VSMC 增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及主要试剂

健康雄性 SD 大鼠 (第三军医大学实验动物中心提供), 体重 $150 \pm 20 \text{ g}$ 。GCIP-27 由上海博亚生物技术公司采用固相方法合成; DMEM 培养基和胎牛

[收稿日期] 2006-03-09 [修回日期] 2006-09-06

[基金项目] 重庆市自然科学基金 (027537) 及攻关项目 (048256)

[作者简介] 程轶群, 硕士研究生, 主要研究方向为心血管药理, E-mail 为 chengyiqun269998@sina.com。通信作者李晓辉, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为心血管及抗炎免疫药理, 电话 023-68753397, E-mail 为 xhl@mail.tmmu.com.cn。张海港, 博士, 副教授, 主要研究方向为信号转导分子药理。

血清为 Gibco 公司产品;四甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、考马斯亮蓝 G-250、Ang Ⅱ 为 Sigma 公司产品;平滑肌肌动蛋白单克隆抗体 α -SM-actin 为 Santa Cruz 公司产品;DAB 显色试剂盒为博士德公司产品;其余化学试剂均为国产分析纯。

1.2 大鼠血管平滑肌细胞的分离培养和鉴定

组织贴壁法培养大鼠主动脉平滑肌细胞^[3]。SD 大鼠断头处死,无菌条件下迅速分离胸主动脉,撕除外膜层,轻刮内膜,将组织剪成 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ 大小的小块,接种于 25 mL 培养瓶中,按等距排列。加入含 20% 胎牛血清的培养基 3 mL,旋紧瓶口。将贴有组织块的一侧朝上,使其不与培养基接触,在 37°C 、5% CO_2 孵箱中贴壁 4~5 h。然后轻轻翻转培养瓶,使组织块浸入培养基中。继续静置培养,第 4~10 天可见有细胞从组织块边缘游出,细胞向外生长形成细胞晕,进而形成细胞簇,待细胞迁移生长至基本汇合成单层(铺满瓶底 80%),即采用 0.25% 胰蛋白酶进行消化传代,传代培养改用含 10% 胎牛血清的 DMEM。通过机械刮除和差异贴壁法^[4]纯化 VSMC。用倒置相差显微镜观察细胞形态及 α -SM-actin 免疫细胞化学方法进行细胞鉴定。选择生长良好的 5~8 代 VSMC 进行实验。

1.3 细胞增殖检测

取生长良好的对数生长期 VSMC,以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔板,培养 24 h,换成无血清的 DMEM 培养基继续培养 24 h,使细胞静止于 G_0/G_1 期。随机分为对照组、Ang Ⅱ 组、GCIP 组(在加入 Ang Ⅱ 的同时加入不同浓度的 GCIP-27)。各组所用培养基均为含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基,Ang Ⅱ 浓度为 10^{-6} mol/L ,GCIP 的浓度分别为 1、3、10、30、100、300、1 000、3 000 和 10 000 $\mu\text{g/L}$,每组设 8 个复孔,继续培养 24 h。磷酸盐缓冲液洗涤后,每孔加入新鲜的 DMEM 培养基,再加入 20 μL MTT (5 mg/mL),继续培养 4 h,小心吸弃上清,每孔加入 150 μL DMSO 振荡 10 min 溶解结晶,于酶联免疫检测仪 490 nm 处测各孔吸光度值(A)。

1.4 细胞总蛋白含量测定

将生长良好的 VSMC 细胞以每孔 1×10^4 个细胞接种于 24 孔板,培养 24 h,换成无血清的 DMEM 培养基继续培养 24 h。随机分为对照组、Ang Ⅱ 组、GCIP 组(在加入 Ang Ⅱ 的同时加入不同浓度的 GCIP-27)。各组所用培养基均为含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基,Ang Ⅱ 的浓度均为 10^{-6} mol/L ,GCIP 的浓度分别为 1、10、100 和 1 000 $\mu\text{g/L}$,每组设 4 个复孔,继续培养 24 h。终止培养时每孔细胞用磷酸

盐缓冲液洗两遍,加入 0.5 mL 氢氧化钠(0.5 mol/L)裂解细胞,用 Bradford 法^[5]检测细胞总蛋白含量。

1.5 细胞计数

将生长良好的 VSMC 细胞以每孔 1×10^4 个细胞接种于 24 孔板,培养 24 h,换成无血清的 DMEM 培养基继续培养 24 h。更换含不同处理因素的条件培养基,分组同细胞总蛋白含量测定,继续培养 24 h,然后将各孔细胞消化,悬浮成为单细胞悬液,置细胞计数板内计数,每孔重复 3 次求平均值,反映细胞增殖情况。

1.6 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异比较采用 SPSS 10.0 软件中单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞培养鉴定

2.1.1 形态学观察 倒置相差显微镜下单个平滑肌细胞呈梭形或带状,有多个细胞突起,胞质丰富,胞质密度高,不透明,核卵圆形居中,有多个核仁。对数生长期的 VSMC,细胞呈梭形状,平行排列成束,部分区域多层重叠,部分区域层数较少或呈单层生长,呈现特征性“峰”、“谷”样生长(图 1)。

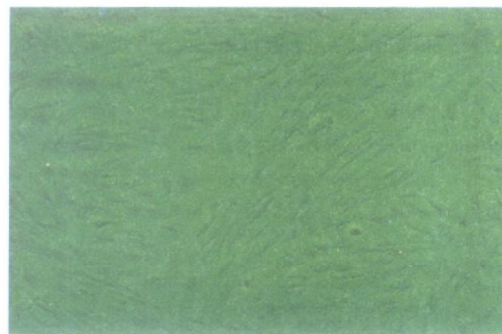


图 1 细胞融合后第 2 代平滑肌细胞形态 ($\times 200$)

2.1.2 免疫细胞化学检测 培养第 5 代的细胞经特异的平滑肌肌动蛋白单克隆抗体 α -SM-actin 免疫细胞化学染色后,胞质着色,呈阳性反应,高倍镜下可见胞质内大量棕色、与细胞长轴平行的纤维细丝,即平滑肌 α 肌动蛋白丝,胞核不着色,阳性率为 95% 以上(图 2)。

2.2 G 蛋白抑制肽对血管紧张素 Ⅱ 诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响

2.2.1 细胞增殖活性 MTT 比色法检测体外培养 VSMC 的增殖活性,结果发现,Ang Ⅱ 组较对照组

明显增高 ($P < 0.01$), GCIP 各剂量组则显著低于 Ang Ⅱ组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); GCIP 各剂量组间比较发现, 剂量相差 100 倍及以上的组间差异才有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 故其在剂量相差 100 倍及以上时呈现浓度依赖性(表 1)。

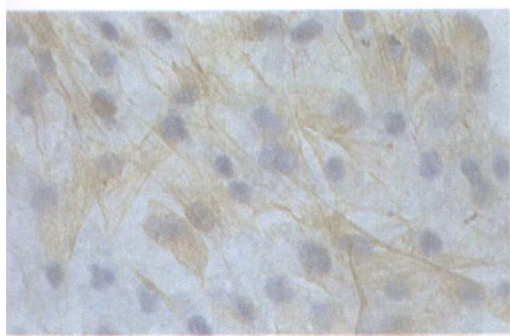


图 2. 血管平滑肌细胞 α -SM-actin 免疫细胞化学染色(200 \times)

表 1. G 蛋白抑制肽对血管紧张素 Ⅱ诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组 别	GCIP 剂量 ($\mu\text{g/L}$)	吸光度值
对照组	—	0.831 \pm 0.033
Ang Ⅱ组	—	0.976 \pm 0.059 ^a
GCIP 组	1	0.911 \pm 0.077
	3	0.906 \pm 0.051
	10	0.878 \pm 0.063 ^b
	30	0.872 \pm 0.069 ^b
	100	0.814 \pm 0.047 ^c
	300	0.811 \pm 0.075 ^c
	1 000	0.792 \pm 0.066 ^c
	3 000	0.782 \pm 0.044 ^c
	10 000	0.771 \pm 0.029 ^c

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与血管紧张素 Ⅱ组比。

2.2.2 细胞总蛋白含量 Ang Ⅱ可使大鼠平滑肌细胞的蛋白含量显著增加, 与对照组相比, 每孔蛋白含量增加 35.2% ($P < 0.01$)。10~1 000 $\mu\text{g/L}$ 的 GCIP-27 则能显著减少 Ang Ⅱ刺激的蛋白含量增加, 与 Ang Ⅱ组相比, 每孔蛋白含量降低 14.4%~39.7% ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 另 GCIP 各剂量组比较发现, 浓度相差 100 倍及以上的组间每孔蛋白含量差异才有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 故其在浓度相差 100 倍及以上时呈现浓度依赖性(表 2)。

2.2.3 细胞计数 Ang Ⅱ可使大鼠平滑肌细胞数量显著增加, 与对照组相比, 细胞数量增加 33.1% ($P < 0.05$)。10~1 000 $\mu\text{g/L}$ 的 GCIP-27 则能显著减

少 Ang Ⅱ刺激的细胞数量增加, 与 Ang Ⅱ组相比, 细胞数量减少 27.7%~39.3% ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); GCIP 各剂量组间细胞数量差异无显著性 ($P > 0.05$, 表 2)。

表 2. G 蛋白抑制肽对大鼠血管平滑肌细胞蛋白含量和细胞数量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组 别	GCIP 剂量 ($\mu\text{g/L}$)	蛋白含量 ($\mu\text{g/孔}$)	细胞数量 ($10^4/\text{孔}$)
对照组	—	65.25 \pm 4.27	8.97 \pm 2.67
Ang Ⅱ组	—	88.25 \pm 5.07 ^b	11.94 \pm 1.69 ^a
GCIP 组	1	83.75 \pm 6.69	9.38 \pm 1.78
	10	75.50 \pm 7.22 ^c	8.63 \pm 1.70 ^c
	100	61.88 \pm 5.31 ^d	8.41 \pm 1.24 ^d
	1 000	53.25 \pm 4.56 ^d	7.25 \pm 1.87 ^d

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与血管紧张素 Ⅱ组比。

3 讨论

血管平滑肌细胞(VSMC)是一种多功能的细胞, 胚胎时期由间充质细胞向合成型细胞转变, 细胞内众多原癌基因高度表达($c-myc$ 、 $c-fos$ 等), 细胞可迁移、合成细胞外基质, 分泌多种血管活性多肽和生长因子。同时细胞也不断地增长繁殖, 对血管的发育(管壁增厚和管径增粗)起重要作用; 出生前 VSMC 逐渐由合成型转变为中间型^[6]。到成年合成型 VSMC 已转变为收缩型 VSMC, 并可对各种机械的或化学的刺激作出舒缩反应。但当血管壁内皮受损或 VSMC 受多种促生长因素作用后, 收缩型 VSMC 又可向合成型 VSMC 转变, VSMC 大量增殖、迁移、合成细胞外基质, 从而引起高血压、动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄和脉管炎等多种心血管疾病的病理改变^[7]。众多资料显示, 所有胞外的这些促生长因素对 VSMC 的增殖作用都需要通过作用于 VSMC 的相应受体, 并通过 G 蛋白介导的信号转导方能引起 VSMC 形态和功能的变化。

G 蛋白即 GTP 结合蛋白(GTP-binding protein), 是一类具有信号传导功能的蛋白质, 其中与跨膜信息传递相关的异源三聚体 G 蛋白由 α 、 β 和 γ 三个亚基组成, 而 α 亚基主要决定 G 蛋白的功能与活性。 α 亚基具有与 GDP、GTP 结合位点和 GTP 酶的活性, 可与细胞膜上跨膜受体偶联, 通过 α -GTP(活性)与 α -GDP(非活性)的“分子开关”形式将胞外信号转导到胞内效应器, 引起胞内一系列蛋白激酶磷酸化及 Ca^{2+} 通道的改变, 调控细胞舒缩、表型转变、迁移、增

殖及合成细胞外基质等生物学行为的变化。而 GCIP 正是本实验室既往工作中针对 G 蛋白 α 亚单位的功能结构域克隆的一种 G 蛋白抑制肽, GCIP 可以通过竞争性抑制 G 蛋白而阻断与 G 蛋白相关的信号转导途径, 并且本室既往研究已证实优筛合成的 GCIP-27 能够抑制由 Ang Ⅱ、内皮素等诱导的心肌细胞肥大和增殖^[8]。

血管紧张素 Ⅱ(Ang Ⅱ) 是一种 8 肽, 近年研究表明血管局部具有肾素-血管紧张素系统, 通过自分泌、旁分泌或自体细胞直接作用而调节血管张力, Ang Ⅱ还可使 fox 癌基因和细胞周期调节基因表达, 促进血管平滑肌细胞增殖^[9]。已经证实, Ang Ⅱ在整体和离体条件下都可以刺激 VSMC 肥大与增殖^[10], 因而在高血压和动脉粥样硬化等多种血管疾病的病理生理机制中具有重要意义^[11]。实验证实, Ang Ⅱ可以双向调节 VSMC 的 Gαq/11 蛋白表达, 其信号转导途径主要都经由血管紧张素 1 型受体-磷脂酶 C 通路介导的。Ang Ⅱ激活 Gαq/11 介导的信号传递是其促 VSMC 增殖肥大的重要信号传导通路^[12]。由此我们选择 Ang Ⅱ作为 VSMC 增殖的刺激因子。

本实验通过 MTT 法、Bradford 法和直接计数法检测细胞增殖活性、细胞总蛋白含量、细胞数量的变化, 结果发现, GCIP-27 能够抑制由 Ang Ⅱ诱导的 VSMC 增殖, 并且在一定范围内存在浓度依赖性。同时我们还发现, 高浓度的 GCIP (100 μg/L 以上) 可使细胞增殖水平比对照组更低, 由此推测, GCIP-27 除了可抑制 Ang Ⅱ的作用外, 还可能抑制其它一些与 G 蛋白相关的刺激因素的生理性促 VSMC 增殖作用, 因为还有许多除 Ang Ⅱ以外的血管活性多肽及因子都可以通过 G 蛋白对 VSMC 的增殖起调控作用, 如内皮素、血管加压素、血小板源生长因子、成纤

维细胞生长因子、胰岛素样生长因子、表皮生长因子、血管内皮细胞生长因子等。本实验证实, Ang Ⅱ对 VSMC 的促增殖作用能被 G 蛋白抑制肽 GCIP-27 所拮抗, 这为寻找新的治疗血管增生性疾病的药物靶点及创新抗心肌重构、血管重构的药物奠定了实验基础, 而 GCIP-27 对其它与 G 蛋白相关的刺激因素促 VSMC 增殖作用的影响还需通过进一步的实验进行研究和验证。

[参考文献]

- [1] Rose R. Atherosclerosis: an inflammatory disease [J]. *N Eng J Med*, 1999, **340** (2): 115
 - [2] 周见至, 李晓辉, 张海港, 唐 渊, 王晓芹. 抗心肌肥大肽 GCIP 表达载体的构建[J]. 第三军医大学学报, 2004, **26** (4): 298-300
 - [3] 蔡文琴. 现代实用细胞与分子生物学实验技术[M]. 北京: 人民军医出版社, 2003; 14-15
 - [4] 周晓莉, 雷 寒, 柳 青. 血管平滑肌细胞的培养及鉴定[J]. 重庆医学, 2005, **34** (6): 877-878
 - [5] 张卓然. 培养细胞学与细胞培养技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004; 429-430
 - [6] 李朝红, 李秀芝, 杨和平, 龙治峰, 朱淑媛, 张新华. 人胚胎主动脉中膜平滑肌细胞表型与原癌基因 c-myc 基因表达关系的研究[J]. 中国动脉硬化杂志, 1995, **3** (2): 185-186
 - [7] Berk BC. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms [J]. *Physiol Rev*, 2001, **81** (3): 999-1030
 - [8] Zhou JZ, Li XH, Zhang HG, Tang Y, Wang XQ. Cloning and gene expression of G protein competitive inhibitory polypeptide and its prophylactic effects on myocardial hypertrophy in vitro [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, **24** (11): 1108-1112
 - [9] Duff JL, Marrero MB, Parton WC, Schieffer B, Bernstein KE, Berk BC. Angiotensin Ⅱ signal transduction and the mitogen activated protein kinase pathways [J]. *Cardiovasc Res*, 1995, **30** (4): 511-517
 - [10] Simon G, Altman S. Subpressor angiotensin II is a bifunctional growth factor of vascular muscle in rats [J]. *Hypertens*, 1992, **10** (10): 1165-1171
 - [11] Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases [J]. *Pharmacol Rev*, 2000, **52** (1): 11-34
 - [12] 邢东琦, 白 桦, 赵亚莉, 吴立玲. 血管紧张素 Ⅱ对血管平滑肌细胞 Gαq/11 的调节及其机制探讨[J]. 科学通报, 2002, **47** (8): 600-603
- (此文编辑 许雪梅)