

缝隙连接阻断剂对体外培养的大鼠血管平滑肌细胞表型转化的影响

宋明宝, 黄 岚, 于学军, 朱光旭, 张 坡, 于世勇, 董红梅

(中国人民解放军第三军医大学新桥医院全军心血管病研究所, 重庆市 400037)

[关键词] 生理学; 血管平滑肌细胞; 缝隙连接; 表型转化; 18α 甘草次酸

[摘要] 目的 探讨缝隙连接阻断剂对大鼠血管平滑肌细胞表型转化的影响。方法 采用贴块法培养大鼠主动脉平滑肌细胞, 细胞免疫荧光染色法检测大鼠主动脉平滑肌细胞缝隙连接蛋白 43 的表达, 荧光漂白后恢复技术检测缝隙连接介导的细胞间通讯。四唑盐比色法测定细胞增殖能力, 逆转录聚合酶链反应法检测平滑肌 α 肌动蛋白的表达, 并观察缝隙连接特异性阻断剂 18α 甘草次酸对上述指标的影响。结果 大鼠血管平滑肌细胞体外培养 3 天后可表达缝隙连接蛋白 43。荧光物质能够通过缝隙连接在相邻细胞间进行传递, 孤立细胞荧光恢复率显著低于相邻细胞 ($7.30\% \pm 0.58\%$ 比 $80.61\% \pm 6.57\%$, $P < 0.01$); 而 18α 甘草次酸能够抑制缝隙连接介导的细胞间通讯, 18α 甘草次酸组荧光恢复率显著低于对照组 ($61.43\% \pm 7.62\%$ 比 $80.61\% \pm 6.57\%$, $P < 0.05$)。 18α 甘草次酸可抑制血管平滑肌细胞增殖, 并且可促进平滑肌 α 肌动蛋白信使核糖核酸的表达。结论 缝隙连接阻断剂可促进大鼠血管平滑肌细胞由合成型向收缩型转化, 提示缝隙连接在调节血管平滑肌细胞表型转化过程起一定作用。

[中图分类号] Q4

[文献标识码] A

Effect of the Blocker of Gap Junction on Phenotypic Transition in Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells

SONG Ming-Bao, HUANG Lan, YU Xue-Jun, ZHU Guang-Xu, ZHANG Po, YU Shi-Yong, and DONG Hong-Mei

(Institute of Cardiovascular Disease of People's Liberation Army, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[KEY WORDS] Vascular Smooth Muscle Cell; Gap Junction; Phenotypic Transition; 18α Glycyrrhetic Acid

[ABSTRACT] Aim To explore the effect of the blocker of gap junction on phenotypic transition in cultured rat vascular smooth muscle cells. Methods Rat aortic smooth muscle cells (SMC) were cultured by explanted rat aortic wall tissue.

Cell immunofluorescence staining was applied to detect the expressions of connexin (Cx) 43 in rat aortic SMC. Fluorescence redistribution after photobleaching (FRAP) was used to measure the communications between cells via gap junctions. MTT and RT-PCR were hired to measure the proliferative capability of rat aortic SMC and the expression of smooth muscle (SM) α actin respectively. Meanwhile, 18α glycyrrhetic acid (18α GA), a specific blocker of gap junction, was administered to observe its effect on the contents above. Results At 3rd day after cultured, Cx43 was expressed in rat aortic SMC. Fluorescent dye could only be transferred between conjugated cells, and mean fluorescence recovery rate in isolated cells were significantly lower compared with that in conjugated cells ($7.30\% \pm 0.58\%$ vs $80.61\% \pm 6.57\%$, $P < 0.01$). Compared to control group, mean fluorescence recovery rate in 18α GA group were significant lower ($61.43\% \pm 7.62\%$ vs $80.61\% \pm 6.57\%$, $P < 0.05$).

Therefore, 18α GA could inhibit dye transfer between conjugated cells. 18α GA could also inhibit the proliferation of rat aortic SMC and promote the expression of SM α actin in cultured rat aortic SMC. Conclusions The blocker of gap junction could promote the phenotypic transition rat aortic SMC from the synthetic to the contractile phenotype, which suggested that gap junction played a role on the phenotypic modulation in cultured rat aortic MSC.

血管平滑肌细胞的增殖、移行及合成细胞外基质所导致的血管不良重塑是高血压、动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄等心血管病的共同发病基础, 而血管平滑肌细胞表型的转化又是平滑肌细胞

增殖和迁移的关键性起始步骤^[1]。因此, 探讨血管平滑肌细胞表型转化的机制在心血管疾病的防治过程中具有重要意义。目前关于血管平滑肌表型转化的机制仍不清楚。生长因子及其抑制剂、细胞外基质、机械性作用力、神经调节以及细胞间相互作用均能影响血管平滑肌细胞的表型转化^[2]。近来研究发现, 缝隙连接介导的细胞间直接通讯也可能影响平滑肌细胞的表型转化^[3]。缝隙连接是相邻细胞间的膜通道结构, 它由细胞膜上的连接子相互衔接而成。每个连接子包含六个相同哑铃形蛋白质亚单位—缝

[收稿日期] 2007-11-27 [修回日期] 2008-02-01

[基金项目] 国家自然科学基金(30570765; 30700889)

[作者简介] 宋明宝, 博士研究生, 讲师, E-mail 为 smb0939@163.com。通讯作者黄岚, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为血管损伤性疾病的防治, E-mail 为 huanglan260@yahoo.com.cn。于学军, 博士后, 副教授, 研究方向为冠心病的防治。

隙连接蛋白(connexin, Cx), 连接子即 Cx 的六聚体所形成的跨膜蛋白通道。该跨膜通道可允许小的信号分子和离子通过, 在维持组织动态平衡、调节细胞生长、发育及分化中具有重要作用^[4]。本研究观察了缝隙连接阻断剂对体外培养的血管平滑肌细胞表型转化的影响, 旨在为血管损伤性疾病的防治提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 试剂

DMEM/F12 培养基和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) 购于美国 Gibco BRL 公司; 6-羧基荧光素乙酸酐盐(6-carboxyfluorescein diacetate, 6-CFDA)、18 α -甘草次酸(18 α -glycyrrhetic acid, 18 α -GA) 及兔抗鼠平滑肌 α -肌动蛋白(SM α -actin) 单克隆抗体购于美国 Sigma 公司; 羊抗缝隙连接蛋白 43 多克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司; 天净沙 RNA 提取试剂盒购于天泽公司; RT-PCR 试剂盒购于上海东洋纺公司; FITC 标记的兔抗山羊 IgG 抗体购于北京中杉公司。6-CFDA 溶于二甲亚砜(DMSO) 中配成 1 g/L 储备液, -20℃ 储存, 负载时用 PBS 稀释成 10 mg/L; 18 α -GA 先溶于 DMSO 中后用 DMEM/F12 培养基稀释至 50 μ mol/L, 过滤除菌后备用。

1.2 实验动物

SPF 级 Sprague-Dawley 大鼠 5 只, 体重 150~180 g, 购于第三军医大学实验动物中心。

1.3 大鼠主动脉平滑肌细胞的培养及鉴定

用颈椎脱臼法处死动物, 在无菌条件下取大鼠胸腹主动脉, 仔细清除血管外膜及脂肪组织, 将血管纵向剖开, 用 0.01 mol/L PBS 漂洗干净, 用眼科镊刮去血管内膜, 放入 50 mL 培养瓶中, 在瓶口用眼科剪剪成约 1.5 mm $\times$ 1.5 mm 大小的组织块, 用吸管将组织块随机铺于瓶底, 置 37℃、5% CO₂ 的培养箱中贴壁 4 h 后加入含 20% FBS 和双抗的 DMEM/F12 培养基继续培养。以后每 3 天更换培养基 1 次。采用抗 SM α -actin 免疫荧光染色鉴定血管平滑肌细胞。

1.4 免疫荧光染色

将细胞接种至 96 孔培养板中, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 3 天后, 吸弃培养液, 用 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次, 加入 4% 多聚甲醛室温孵育 20 min, 用 PBS 洗涤 3 min $\times$ 3 次, 加入 0.3% Triton-X100 室温孵育 10 min, PBS 洗涤 5 min $\times$ 3 次, 加入 10% 正常封闭液置于 37℃ 孵育 30 min, 吸弃封闭液, 加入 1:100 稀释的羊抗 Cx43 多克隆抗体或 1:800 稀释兔

抗鼠 SM α -actin, 4℃ 过夜, PBS 洗涤 5 min $\times$ 3 次, 加入 1:200 稀释的 FITC 标记的兔抗羊 IgG 或罗丹明标记的兔抗鼠 IgG 抗体, 37℃ 孵育 60 min, PBS 洗涤后置于荧光显微镜检测。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.5 荧光漂白后恢复试验

将第 3 代平滑肌细胞以 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种于预先放置 20 mm $\times$ 20 mm 盖玻片的 6 孔培养板中进行细胞爬片。3 天后取细胞玻片, PBS 漂洗 2 次, 加入 10 mg/L 6-CFDA, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 10~15 min, 用 PBS 液洗掉细胞外多余的 6-CFDA, 以保证背景纯净。将贴附有细胞的玻片放入直径 2 cm 的碟形小室中, 加入少量不含血清的培养基上机进行检测。18 α -GA 组加入 50 μ mol/L 18 α -GA。实验中选择 3 种细胞: 第 1 种是与周围其他细胞紧密连接的细胞, 需用激光去淬灭, 他们之间存在缝隙连接通讯, 是实验数据的来源, 其荧光漂白恢复程度反映细胞间缝隙连接通讯功能的强弱; 第 2 种是孤立的细胞, 与周围其它细胞相分离, 不存在缝隙连接通讯, 用作实验自身对照; 第 3 种是周围与其它细胞紧密连接但不需要激光淬灭的细胞, 因为荧光物质即使在无激光照射下, 也有自身的荧光漂白作用, 选择作为背景校正。淬灭的激光能量为 500 mW, 漂白脉冲时间 200 ms, 计算机精确定位后, 发射激光束对选定细胞内的荧光进行淬灭。激光漂白后每 15 s 扫描摄像 1 次, 获取扫描图像共 20 帧, 得到漂白细胞荧光的恢复及相邻接触的未漂白细胞荧光的变化情况, 观测被激光淬灭的平滑肌细胞内荧光强度动态恢复过程和最终恢复水平。计算荧光恢复率。每组随机选取 20 个细胞进行检测。

1.6 四唑盐比色法测定细胞增殖能力

将细胞按 $1 \times 10^4/\text{孔}$ 的密度接种至 96 孔培养板中, 每组设 4 个复孔, 其中 GA 组加入 18 α -GA 使其终浓度为 50 μ mol/L, 置 37℃、5% CO₂ 条件下进行培养。3 天后每孔加入 MTT 溶液 20 μ L, 继续孵育 4 h, 终止培养, 小心吸弃上清液。每孔加入 150 μ L DMSO, 振荡 10 min。在酶联免疫检测仪上 562 nm 波长比色, 以单纯 DMEM/F12 调零测定各孔平均吸光度值。每组中取 5 个孔的平均值作为一次实验的测量值, 实验共重复 3 次。

1.7 逆转录聚合酶链反应检测平滑肌 α -肌动蛋白 mRNA 的表达

将细胞按 $1 \times 10^8/\text{L}$ 的密度接种至培养瓶中, 18 α -GA 组加入 18 α -GA, 终浓度为 50 μ mol/L, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中下培养 3 天, 待细胞达到

60% 汇合后终止培养。按 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA。SM α actin 上游引物 5'-ACT GGG ACG ACA TGG AAA AG-3', 下游引物 5'-CAT CTC CAG AGT CCA GCA CA-3', 扩增产物长度为 240 bp; GAPDH 内参上游引物 5'-GCA AGT TCA ACG GCA CAG-3', 下游引物 5'-TAC TCA GCA CCA GCA TCA CC-3', 扩增产物长度为 121 bp。各样品取 1 μ g RNA, 进行 cDNA 合成及 PCR 扩增。热启动法进行 PCR, 94 $^{\circ}$ C 变性 10 s $\rightarrow$ 57 $^{\circ}$ C 退火 30 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 共 30 个循环。取 20 μ L 扩增产物于 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察, 溴化乙锭染色后于凝胶图像分析仪 (Bi-Rad, 美国) 进行扫描并用 Quantity One 软件分析, 计算 SM α actin mRNA 与 GAPDH 光密度比值。实验重复 3 次。

1.8 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠血管平滑肌细胞的鉴定

培养 5 天左右可见长梭型细胞自组织块边缘长出, 培养 14 天左右可见细胞汇合成层并平行排列, 传代后呈“谷一峰”样生长。3 天后可达到 60% 汇合。SM α actin 免疫荧光染色呈阳性, 说明培养的细胞是血管平滑肌细胞 (图 1)。

2.2 缝隙连接蛋白 43 的免疫荧光染色

血管平滑肌细胞 Cx43 免疫荧光染色为阳性, 而阴性对照组免疫荧光染色阴性 (图 2)。

2.3 荧光恢复率比较

荧光显微镜下, 经 CFDA 标记的平滑肌细胞胞核与胞质均匀负载绿色荧光, 背景纯正, 无绿色荧

光。选择孤立的平滑肌细胞, 经瞬间激光淬灭后, 细胞内荧光强度明显减弱; 随着时间的推移, 细胞内荧光强度基本没有恢复。选择相邻的平滑肌细胞, 经瞬间激光淬灭后, 细胞内荧光强度明显减弱; 随着时间的推移, 细胞内荧光强度逐渐恢复, 至 4 min 时, 荧光强度恢复到一定水平并趋于稳定, 荧光恢复率为 $80.61\% \pm 6.57\%$ 。而给予 18α -GA 干预后, 其荧光恢复时间显著延迟, 荧光恢复率为 $61.43\% \pm 7.62\%$, 显著低于对照组 ($P < 0.05$; 图 3)。孤立的平滑肌细胞荧光恢复率为 $7.3\% \pm 0.58\%$, 相邻的平滑肌细胞荧光恢复率显著高于孤立的平滑肌细胞 ($P < 0.01$)。

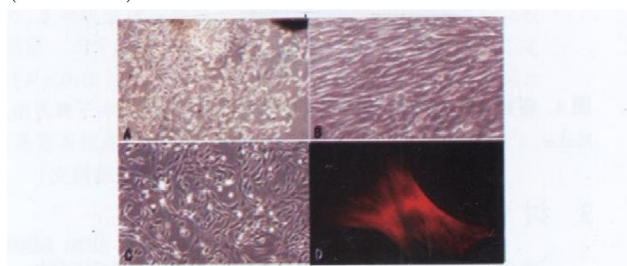


图 1. 体外培养的血管平滑肌细胞形态学特征及其鉴定
A 为贴块 5 天 ($\times 50$), B 为培养 14 天 ($\times 100$), C 为传代后 3 天 ($\times 50$), D 为免疫荧光染色呈阳性 ($\times 200$)。

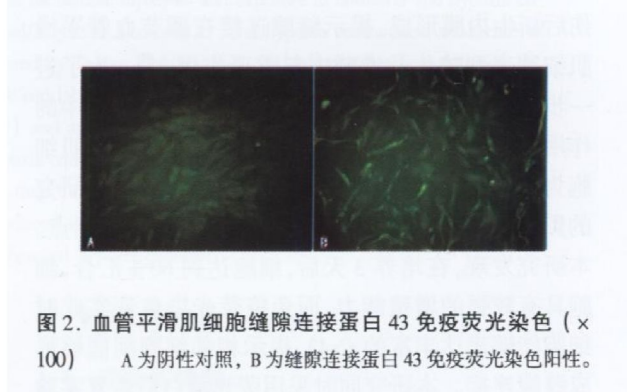


图 2. 血管平滑肌细胞缝隙连接蛋白 43 免疫荧光染色 ($\times 100$)
A 为阴性对照, B 为缝隙连接蛋白 43 免疫荧光染色阳性。

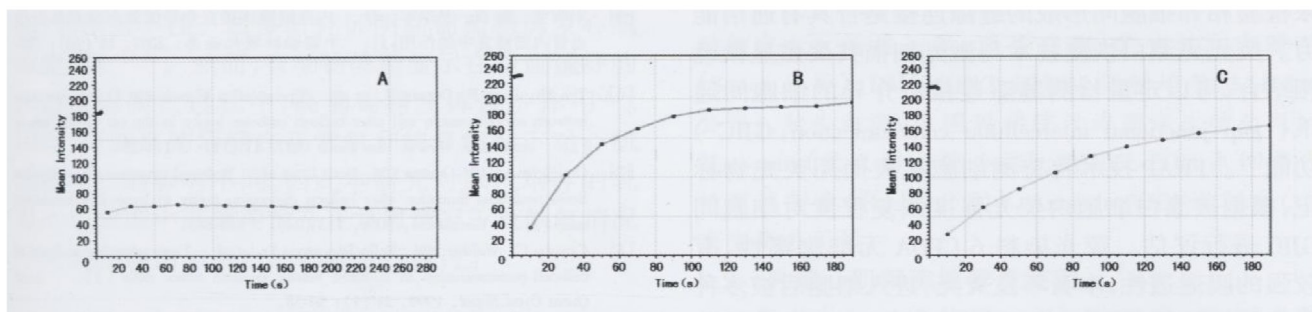


图 3. 各种细胞荧光漂白后恢复的动力曲线 A 为孤立的细胞, B 为对照组相邻细胞, C 为 18α -甘草次酸干预组相邻细胞。

2.4 18α -甘草次酸对细胞增殖能力的影响

对照组吸光度值为 0.563 ± 0.081 , 而 18α -GA 干

预组为 0.465 ± 0.016 , 两组相比差异显著 ($P < 0.05$)。

2.5 平滑肌 α 肌动蛋白 mRNA 的表达

18 α -GA 干预组平滑肌 α actin mRNA 的表达显著高于对照组 (1.084 ± 0.13 比 0.884 ± 0.09 , $P < 0.05$; 图 4)。

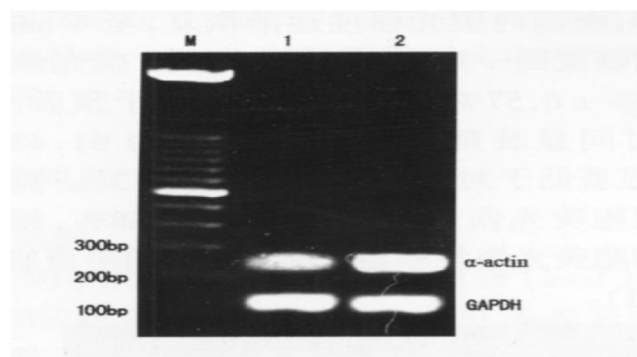


图 4. 各组平滑肌 α 肌动蛋白 mRNA 的表达 ($n = 3$) M 为 Marker, 1 为对照组, 2 为 18 α 甘草次酸干预组。

3 讨论

血管平滑肌细胞异常增殖是许多心血管疾病的共同病理基础。血管内膜损伤后, 中膜血管平滑肌细胞增殖、迁移至内膜层所致的血管不良重塑导致血管狭窄。研究发现, 减少 Cx43 表达能抑制血管损伤后新生内膜形成, 提示缝隙连接在调节血管平滑肌细胞表型转化及增殖中起重要作用^[5,6]。为了进一步探讨缝隙连接在血管平滑肌细胞表型转化中的作用, 本研究采用体外培养的大鼠主动脉平滑肌细胞为研究对象。为了尽量排除细胞接触抑制对研究的影响, 我们选用细胞培养 3 天作为研究的时间点。本研究发现, 在培养 3 天后, 细胞达到 60% 汇合, 细胞具有较强的增殖能力, 而免疫荧光染色证实此时细胞能够表达丰富的 Cx43, 提示相邻细胞间能够形成缝隙连接。本研究同时采用荧光漂白后恢复实验来检验相邻细胞间形成的缝隙连接是否具有通信能力。荧光漂白恢复技术与激光扫描共聚焦显微镜相结合, 可以定量检测缝隙连接所介导的细胞间通讯 (gap junctional intercellular communication, GJIC) 功能^[7]。FRAP 技术将待测细胞从表面用荧光物标记, 根据被漂白细胞内荧光强度恢复程度对细胞间 GJIC 进行评估。荧光染料 6-CFDA 无细胞毒性, 有较强的膜通透性, 本身不发荧光, 进入细胞后被多种非特异性酯酶分解成代谢产物 5, 6-CFDA。带电荷的水解产物可被 488 nm 的激光激发出黄绿色荧光, 且无膜通透性, 因此荧光物质进入细胞后无法通过细胞膜外溢, 只有通过细胞间缝隙连接通道才能相互交换^[8]。由于荧光漂白过程是不可逆的, 荧光恢

复过程可准确地反映荧光标记物的运动。对细胞内荧光强度进行定时定量监测, 从而准确反应细胞的 GJIC 功能情况。本研究发现, 相邻平滑肌细胞荧光恢复率为 $80.61\% \pm 6.57\%$, 而孤立平滑肌细胞几乎无荧光恢复, 提示平滑肌细胞间存在丰富的缝隙连接, 且其细胞间的通讯活跃, 而缝隙连接特异性阻断剂 18 α -GA 能够阻断平滑肌细胞间的这种通讯。

血管平滑肌细胞分为分化型 (收缩型) 和去分化型 (合成型) 2 种表型。损伤后在生长因子作用下, 血管平滑肌细胞可由分化型转变为去分化型, 从中膜向内膜下迁移并增殖, 合成大量细胞外基质, 这个过程称为表型转化, 而平滑肌的表型转化是平滑肌细胞异常增殖的前提。平滑肌 α actin、平滑肌肌球蛋白重链、h α calponin 和平滑肌 22 α actin 表达是分化型血管平滑肌细胞表型的重要标志^[9,10]。本研究发现, 给予缝隙连接阻断剂 18 α -GA 干预后, 平滑肌 α actin mRNA 表达显著增加, 18 α -GA 干预后平滑肌细胞的增殖能力与对照组相比显著下降, 说明缝隙连接阻断剂可促使细胞由合成型向收缩性转化, 提示缝隙连接在调节血管平滑肌细胞转化方面扮演一定角色。因此, 进一步探讨缝隙连接在血管平滑肌细胞表型转化过程中的作用及其可能的机制为血管损伤性疾病的防治提供新的思路。

【参考文献】

- [1] Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease [J]. *Physiol Rev*, 2004, **84** (3): 767-801.
- [2] Hirano K. The roles of proteinase-activated receptors in the vascular physiology and pathophysiology [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, **27** (1): 27-36.
- [3] Liao Y, Regan CP, Manabe I, et al. Smooth muscle-targeted knockout of connexin 43 enhances neointimal formation in response to vascular injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, **27** (5): 1037-1042.
- [4] 辛莉, 郭国庆, 沈伟哉. 间隙连接蛋白家族的研究进展 [J]. *中国病理生理杂志*, 2007, **23** (6): 1240-1243.
- [5] 宋明宝, 黄岚, 于学军, 等. 内皮缝隙连接在介导细胞间交联和损伤血管内皮修复中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (10): 725-728.
- [6] Yeh HI, Lupu F, Dupont E, et al. Upregulation of connexin 43 gap junctions between smooth muscle cell after balloon catheter injury in the rat carotid artery [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17** (11): 174-184.
- [7] Chadichristos CE, Matter CM, Roth I, et al. Reduced connexin 43 expression limits neointima formation after balloon distension injury in hypercholesterolemic mice [J]. *Circulation*, 2006, **113** (24): 2835-2843.
- [8] Carruba G, Webber MM, Bello-DeCampo D, et al. Laser scanning analysis of cell-cell communication in cultured human prostate tumor cells [J]. *Anal Quant Cytol Histol*, 1999, **21** (1): 54-58.
- [9] 张新平, 庞月华, 冯义伯, 等. p38 和丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1 在内膜损伤后血管平滑肌细胞表型转化过程中的表达变化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (2): 127-131.
- [10] Owens GK. Molecular control of vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic plasticity [J]. *Novartis Found Symp*, 2007, **283**: 174-191.

(此文编辑 文玉珊)