

苯扎贝特对血小板源生长因子诱导的血管平滑肌细胞增殖和小凹蛋白 1 表达的影响

王大杰, 张延斌, 许旭光, 徐斌, 徐通达, 李东野

(徐州医学院附属医院心内科, 江苏省徐州市 221000)

[关键词] 苯扎贝特; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖; 血小板源生长因子; 小凹蛋白 1; 细胞培养

[摘要] 目的 观察苯扎贝特对血小板源生长因子诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖及小凹蛋白 1 表达的影响并探讨其机制。方法 体外植块贴壁法培养大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞, 噻唑兰比色法检测各组细胞增殖情况, Western Blotting 法观察各组小凹蛋白 1 的表达情况。结果 不同浓度的苯扎贝特对血小板源生长因子诱导的血管平滑肌细胞增殖均有一定的抑制作用, 随浓度增加, 其抑制作用增强 ($P < 0.01$)。血小板源生长因子干预组小凹蛋白 1 的表达较对照组明显降低 ($P < 0.01$), 而用不同浓度的苯扎贝特干预后小凹蛋白 1 的表达明显升高 ($P < 0.01$), 且随着苯扎贝特浓度增加, 小凹蛋白 1 的表达明显增加。结论 苯扎贝特抑制血小板源生长因子诱导的血管平滑肌细胞增殖的同时可以上调小凹蛋白 1 的表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Bezafibrate on the Expression of Caveolin-1 and the Proliferation of Smooth Muscle Cells Induced by Platelet-Derived Growth Factor

WANG Da-Jie, ZHANG Yan-Bin, XU Xu-Guang, XU Bin, XU Tong-Da, and LI Dong-Ye

(Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221000, China)

[KEY WORDS] Pathophysiology; Bezafibrate; Vascular Smooth Muscle Cells; Proliferation; Platelet-Derived Growth Factor; Caveolin-1; Cell Culture

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effects of bezafibrate on the expression of caveolin-1 and the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) induced by platelet-derived growth factor (PDGF) and investigate the mechanism of it.

Methods VSMC were cultured in vitro, the proliferation of VSMC were obtained through thiazolyl blue colorimetric technique (MTT). The expression of caveolin-1 was assayed by Western Blotting. **Results** Compared with the control group, PDGF could increasingly induce the proliferation of VSMC ($P < 0.01$). Bezafibrate inhibited the proliferation of VSMC induced by PDGF in concentration-dependent manner ($P < 0.01$). Compared with the control group, PDGF could decrease caveolin-1 protein expression ($P < 0.01$). Bezafibrate increase the expression of caveolin-1 compared with the PDGF group ($P < 0.01$). With the increase of Bezafibrate's concentration, the expression of caveolin-1 could increase accordingly. **Conclusion** Bezafibrate can decrease the proliferation of VSMC induced by PDGF and increase the expression of caveolin-1 protein.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 增殖是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 斑块形成和 PCI 术后再狭窄的关键性环节之一。在已知的生长因子中, 血小板源生长因子 BB (platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB) 诱导 VSMC 增殖的作用强, 能通过多种途径显著促进 VSMC 增殖, 在 As 和 PCI 术后再狭窄发生、发展中起重要作用^[1-3]。

贝特类调脂药是过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptors α , PPAR α) 的人工合成配体, 目前研究显示具有抗 As 作用^[4], 但从小凹蛋白 1 (caveolin-1) 水平研究其在 PDGF 诱导的 VSMC 增殖中的作用还未见报道。本研究通过观察苯扎贝特对 PDGF 诱导的 VSMC 增殖和 caveolin-1 蛋白的影响, 探讨其抗 As 的作用机制, 为贝特类药物在 As 和 PCI 术后再狭窄的治疗提供进一步理论依据。

[收稿日期] 2009-09-22

[修回日期] 2009-12-05

[作者简介] 王大杰, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为冠心病介入治疗的基础与临床, E-mail 为 wdj60999@163.com。李东野, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心脏超声及心血管病分子生物学, 联系电话为 051-685802016, E-mail 为 dongyel@med-mail.com.cn。通讯作者张延斌, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病介入治疗的基础与临床, E-mail 为 zhangyanbin99@sina.com。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

雄性 SD 大鼠购自徐州医学院实验动物中心,

胎牛血清购自杭州四季青公司, 细胞培养基 (duLbecco's minimum essential medium, DMEM) 和二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自 Gibco 公司, 兔抗鼠 SM- α -actin 单克隆抗体购自武汉博士德生物公司, 苯扎贝特由徐州恩华制药有限公司生产并馈赠, PDGF-BB 和噻唑兰购自 Sigma 公司, caveolin-1 抗体和山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 血管平滑肌细胞培养及鉴定

体外植块贴壁法培养大鼠胸主动脉 VSMC。无菌条件下取新鲜 SD 大鼠胸主动脉, 剥去血管外膜, 除去血管内膜内皮细胞, 剪成大小约 1.0 mm \times 1.0 mm、边缘锐利的组织块, 移入培养瓶底壁, 置于 37°C 的 5% CO₂ 培养箱中培养。2~3 周后相差显微镜下见细胞 70%~80% 融合, 用 0.25% 胰蛋白酶消化、传代培养。取第 2 代细胞光学倒置显微镜下观察细胞形态学及 SM- α -actin 单克隆抗体免疫组织化学染色鉴定培养细胞。取 3~5 代对数生长期的 VSMC 用于实验。

1.3 细胞毒性实验

将所得 VSMC 接种于 24 孔板, 融合生长呈单层后加入终浓度为 50~200 μ mol/L 的苯扎贝特溶液培养 48 h 台盼蓝染色, 细胞计数。

1.4 实验分组

将所得 VSMC 分成 5 组: 对照组 (加入 DMSO), PDGF 组 (20 μ g/L PDGF-BB), PDGF+ 低浓度苯扎贝特组 (50 μ mol/L), PDGF+ 中浓度苯扎贝特组 (100 μ mol/L), PDGF+ 高浓度苯扎贝特组 (200 μ mol/L)。

1.5 噻唑兰比色法检测细胞增殖

将所得 VSMC 消化、离心, 收集细胞, 调整 VSMC 密度至 5×10^7 /L 以每孔 200 μ L 接种于 96 孔板, 每组重复设 6 孔, 用含 20% 的胎牛血清 DMEM 培养至细胞近 70%~80% 融合时改用无血清 DMEM 继续培养 24 h。按实验分组给药仍用 20% 的胎牛血清 DMEM 培养基培养 20 h 后加入噻唑兰溶液 (5 g/L) 20 μ L, 继续培养 4 h 终止培养, 吸净培养液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 微量振荡器振荡 10 min 在 490 nm 波长下用全自动酶标仪测定各孔的吸光度 OD 值。

1.6 Western blot 检测小凹蛋白 1 的表达

将所得 VSMC 用胰蛋白酶制备细胞悬液, 调整细胞密度, 使 VSMC 同步化, 处于 G₀/G₁ 期。按实验分组药物干预后, VSMC 经细胞裂解缓冲液充分裂解, 12 kr/min 离心 5 min 取上清液。分离所收集

的蛋白质溶液并转膜, 特异性 caveolin-1 抗体 (一抗, 1: 200) 作用于滤膜后, 用碱性磷酸酶标记的羊抗兔单克隆抗体 (二抗, 1: 1 000) 与 caveolin-1 抗体结合, 最后在 NBT/BCIP 显色液下显色, 显示条带, 并通过 Image J 软件进行密度分析, 得出灰度值。

1.7 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.5 统计软件建立数据库, 多组比较采用单向方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞鉴定

光学倒置显微镜下观察细胞形态为长索条形、菱形, 细胞核清晰, 未见空泡, 细胞边界清楚 (图 1)。免疫组织化学染色鉴定培养细胞低倍镜下可见细胞胞浆普遍被染成黄褐色, 呈阳性反应, 高倍镜下可见细胞胞浆内均匀分布 SM- α -actin, 表明所得细胞为 VSMC (图 2)。

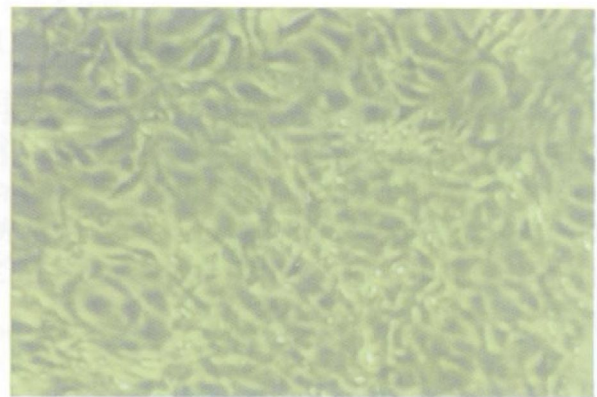


图 1 原代培养的血管平滑肌细胞 (倒置显微镜, $\times 100$)



图 2 免疫细胞化学染色法鉴定的血管平滑肌细胞 (光镜, $\times 400$)

2.2 细胞毒性实验

50~200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的苯扎贝特对 VSMC 生长无毒性反应, VSMC 存活率 95% 以上。

2.3 血管平滑肌细胞增殖的检测

噻唑兰比色法检测结果显示 PDGF-BB 能明显促进 VSMC 的增殖, 不同浓度苯扎贝特对 PDGF-BB 诱导的 VSMC 增殖均有一定的抑制作用, 且随浓度增加, 其抑制作用增强 ($P < 0.01$, 表 1)。

表 1 苯扎贝特对血小板源生长因子诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	24小时 OD值
对照组	0.319 \pm 0.009
PDGF组	0.487 \pm 0.019 ^a
PDGF+低浓度苯扎贝特组	0.308 \pm 0.012 ^b
PDGF+中浓度苯扎贝特组	0.224 \pm 0.011 ^{ab}
PDGF+高浓度苯扎贝特组	0.146 \pm 0.013 ^{ab}

a为 $P < 0.01$ 与对照组比较; b为 $P < 0.01$ 与 PDGF组比较。

2.4 苯扎贝特对小凹蛋白 1 表达的影响

PDGF 干预后小凹蛋白 1 蛋白的表达较对照组明显降低 ($P < 0.01$), 用不同浓度的苯扎贝特干预后小凹蛋白 1 蛋白的表达较 PDGF 组明显升高 ($P < 0.01$), 且随苯扎贝特浓度增加, caveolin-1 蛋白表达也逐渐增加, 各组间比较亦有统计学意义 (图 3 和表 2)。

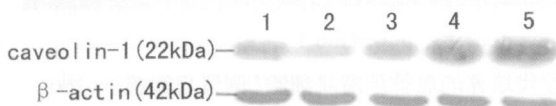


图 3 苯扎贝特干预后小凹蛋白 1 蛋白的表达情况 1 为对照组, 2 为 PDGF 组, 3 为 PDGF 组 + 低浓度苯扎贝特组, 4 为 PDGF 组 + 中浓度苯扎贝特组, 5 为 PDGF 组 + 高浓度苯扎贝特组。

表 2 苯扎贝特对小凹蛋白 1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	灰度值
对照组	6748.13 \pm 19.10
PDGF组	3446.57 \pm 25.58 ^a
PDGF+低浓度苯扎贝特组	5735.27 \pm 21.35 ^b
PDGF+中浓度苯扎贝特组	10854.61 \pm 35.02 ^{ab}
PDGF+高浓度苯扎贝特组	16085.12 \pm 49.52 ^{ab}

a为 $P < 0.01$ 与对照组比较; b为 $P < 0.01$ 与 PDGF组比较。

3 讨论

动脉粥样硬化和冠心病 PCI 术后再狭窄是一个复杂的病理过程, VSMC 增殖在 As 斑块形成和 PCI 术后再狭窄起关键作用。在已知的生长因子中, PDGF-BB 诱导 VSMC 增殖的作用强, 出现在 As 和 PCI 术后再狭窄的各个阶段, 它在 As 和 PCI 术后再狭窄发生、发展中起重要作用^[1]。PDGF 有两个不同的多肽链 A 和 B, 有二硫键相连而组成的二聚体, 可组成 3 种异构体, PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB。研究发现, PDGF-BB 能通过多种途径显著促进 VSMC 增殖^[2,3], 提示在 As 及 PCI 术后再狭窄形成与发展过程, PDGF-BB 可能起到重要作用。因此, 本实验应用 PDGF-BB 诱导建立 VSMC 增殖模型。本实验结果表明, PDGF-BB 可以明显诱导 VSMC 增殖, 与文献 [2,3] 结论一致。PPAR α 是核受体超家族的一员, 目前研究显示其具有抗 As 作用^[4], PPAR α 配体通过对细胞周期蛋白依赖激酶抑制剂 P16INK4a 的诱导作用实现阻断 VSMC 的 G₁/S 细胞循环周期, 从而抑制其增殖^[5]。本研究结果表明, 不同浓度苯扎贝特对 PDGF-BB 诱导的 VSMC 增殖均有明显的抑制作用, 且随浓度增加, 其抑制作用增强。说明苯扎贝特能有效抑制 VSMC 的增殖, 这为治疗和预防 As 斑块形成和 PCI 术后再狭窄提供一个很好的方向。

细胞质膜微囊 (caveolae) 是细胞表面质膜向内凹陷所形成的特异性囊泡样结构, 直径约 50~100 nm。近年来研究表明, 其标志性的结构蛋白 caveolin-1 对许多关键信号分子的活性状态起着直接的调节作用。caveolin 有 caveolin-1、caveolin-2 和 caveolin-3 等 3 种, 在 VSMC 上主要表达 caveolin-1 和 caveolin-2 其中 caveolin-1 起着主要的作用, caveolin-2 参与 caveolin-1 的作用但不具有单独的生理功能^[6-7]。李世焯等^[8]发现 caveolae 及其蛋白 caveolin-1 与 As 形成过程中 VSMC 增殖和泡沫化密切相关。Peterson 等^[9]利用培养的人冠状动脉 VSMC 研究动脉粥样硬化发生过程中 PDGF 与 caveolin-1 的关系时发现, VSMC 培养基中加入 PDGF 后, caveolin-1 蛋白表达成剂量依赖性减少, 且这种下降与 PDGF 的浓度有关, 呈浓度依赖性, 而 VSMC 中 caveolin-1 蛋白高表达可以阻止 G₀ 期细胞进入 G₁ 期和 S 期, 从而抑止 VSMC 的增殖。本研究结果同时还表明, PDGF-BB 可明显抑制 VSMC 的 caveolin-1 蛋白的表达, 而不同浓度苯扎贝特对 PDGF-BB 干预

(下转第 1032 页)

(上接 1004 页)

下 VSMC 的 caveolin-1 蛋白的表达均有明显的上调作用,且随苯扎贝特浓度增加,其上调 caveolin-1 蛋白的表达作用增强。说明苯扎贝特抑制 VSMC 增殖的同时还上调 caveolin-1 蛋白的表达,且随着浓度增加,表达作用增强。这为临床上使用贝特类药物治疗 As 和 PCI 术后再狭窄提供了新的证据。但苯扎贝特上调 caveolin-1 蛋白表达是否为其抑制 VSMC 增殖进而抗 As 斑块形成和 PCI 术后再狭窄的机制之一及其具体信号通路还有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Brehm BR, Wolf SC, Bertsch D, et al. Effects of nebivolol on proliferation and apoptosis of human coronary artery smooth muscle and endothelial cells [J]. *Cardiovasc Res* 2001, **49** (2): 430-439
- [2] 黄佐,任雨笙,杜荣增,等. 血小板源生长因子 BB 对人血管平滑肌细胞钙调素的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **1** (6): 523-525
- [3] Sakakibara K, Kubota K, Worku B, et al. PDGF-BB regulates p27 expression through ERK-dependent RNA tum-over in vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 2005, **280** (27): 25 470-477.
- [4] 吴洁,赵水平,邓平,等. 非诺贝特对高胆固醇喂养兔主动脉斑块面积和肿瘤坏死因子 α 的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (4): 313-316
- [5] Gizard F, Amant C, Barbier O, et al. PPAR alpha inhibits vascular smooth muscle cell proliferation underlying intimal hyperplasia by inducing the tumor suppressor p16NK4a [J]. *J Clin Invest* 2005, **115** (11): 3 228-238
- [6] Frank PG, Lisanti MP. Caveolin-1 and caveolae in atherosclerosis: differential roles in fatty streak formation and neointimal hyperplasia [J]. *Curr Opin Lipidol* 2004, **15** (5): 532-539
- [7] Halayko AJ, Stehnick GL. The association of caveolae, actin, and the dystrophin-glycoprotein complex: a role in smooth muscle phenotype and function [J]? *Can J Physiol Pharmacol* 2005, **83** (10): 877-891.
- [8] 李世煌,张慧,段才闻,等. 氧化型低密度脂蛋白对血管平滑肌细胞小凹蛋白 1 表达的抑制作用及其与信号调节酶的关系 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (3): 178-180
- [9] Peterson TE, Guicciardi ME, Gulati R, et al. Caveolin-1 can regulate vascular smooth muscle cell fate by switching platelet-derived growth factor signaling from a proliferative to an apoptotic pathway [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, **23** (9): 1 52-527.

(此文编辑 李小玲)