

[文章编号] 1007-3949(2010)18-05-0345-06

• 实验研究 •

碱性成纤维细胞生长因子在烟草烟雾诱导大鼠血管平滑肌细胞增殖中的作用

耿雷^{1,2}, 刘闰男¹

(1. 中国医科大学附属第一医院心血管内科, 辽宁省沈阳市 110001; 2. 抚顺市中医院, 辽宁省抚顺市 113000)

[关键词] 烟草烟雾提取物; 碱性成纤维细胞生长因子; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖

[摘要] 目的 探讨烟草烟雾提取物对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响及碱性成纤维细胞生长因子在其中的作用。方法 按不同浓度烟草烟雾提取物(0.2%、5%、10%和20%)分为对照组、低浓度、中等浓度、高浓度和过高浓度烟草烟雾提取物组刺激血管平滑肌细胞,采用MTT法观察细胞增殖变化,免疫细胞化学法测定碱性成纤维细胞生长因子和增殖细胞核抗原蛋白的表达,同时用逆转录-聚合酶链反应法检测碱性成纤维细胞生长因子 mRNA 表达。用筛选出的最适烟草烟雾提取物浓度处理大鼠血管平滑肌细胞不同时间(0、4、8、12 h和24 h)后,检测碱性成纤维细胞生长因子 mRNA 及碱性成纤维细胞生长因子和增殖细胞核抗原蛋白的变化。用碱性成纤维细胞生长因子抗体和最适浓度烟草烟雾提取物干预血管平滑肌细胞24 h后检测细胞增殖及碱性成纤维细胞生长因子和增殖细胞核抗原蛋白表达的变化。结果 (1)与对照组相比,低浓度烟草烟雾提取物组($P < 0.05$)和中浓度组血管平滑肌细胞增加明显($P < 0.01$),而高浓度组和过高浓度组与对照组比较差异无显著性($P > 0.05$)。碱性成纤维细胞生长因子 mRNA、蛋白和增殖细胞核抗原蛋白在对照组中有少量表达,低浓度烟草烟雾提取物组表达增加($P < 0.01$),中浓度烟草烟雾提取物组达到高峰,高浓度和过高浓度烟草烟雾提取物组仍高于对照组($P < 0.01$)。(2)对照组(不加烟草烟雾提取物组即0 h组)血管平滑肌细胞中有少量碱性成纤维细胞生长因子 mRNA、蛋白和增殖细胞核抗原蛋白表达。低浓度烟草烟雾提取物刺激4 h后细胞内碱性成纤维细胞生长因子 mRNA、蛋白和增殖细胞核抗原蛋白表达增加($P < 0.01$),碱性成纤维细胞生长因子 mRNA 于8 h达高峰;碱性成纤维细胞生长因子和增殖细胞核抗原蛋白于12 h达高峰。(3)碱性成纤维细胞生长因子抗体可显著抑制5%烟草烟雾提取物诱导的血管平滑肌细胞增殖和碱性成纤维细胞生长因子、增殖细胞核抗原蛋白表达增加。结论 低浓度和中浓度烟草烟雾提取物对大鼠血管平滑肌细胞的促增殖作用逐渐增加;高浓度和过高浓度组时促增殖作用反而减弱。烟草烟雾提取物可能是通过增加碱性成纤维细胞生长因子的表达促进大鼠血管平滑肌细胞的增殖。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Cigarette Smoke Extract Induced VSMC Proliferation Via the Basic Fibroblast Growth Factor

GENG Lei^{1,2}, and LU Guinan¹

(1. Department of Cardiology, The First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001; Fushun Hospital of Traditional Chinese Medicine, Fushun 113000 China)

[KEY WORDS] Cigarette Smoke Extract Basic Fibroblast Growth Factor Vascular Smooth Muscle Cell Cell Proliferation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of cigarette smoke extract (CSE) on the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) and the relevant roles of basic fibroblast growth factor (bFGF). **Methods** (1) The rat aortic smooth muscle cells were treated with various concentrations of cigarette smoke extract (0%, 2.5%, 5.0%, 10.0%, 20.0%), the VSMC treated without CSE were control group then MTT assay was performed to observe the changes of the proliferation of VSMC. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Fibroblast Growth Factor 2 (bFGF) were detected by immunocytochemistry. In addition, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was applied to detect the mRNA expression of bFGF. (2) Treated with 5% CSE (the optimal concentration) at 0 h (control group), 4 h, 8 h, 12 h, 24 h the expression of bFGF mRNA, bFGF and PCNA protein were observed. (3) Treated with bFGF antibody and 5% CSE at 24 h, MTT A value, bFGF and PCNA protein were observed. **Results** (1) CSE can stimulate the increase of MTT absorbance (A) value. The absorbance (A) value of 2.5% ($P < 0.05$), 5.0% CSE ($P < 0.01$) group were significantly increased compared to the control group. The absorbance (A) value of 10%, 20% CSE

[收稿日期] 2009-12-25 [修回日期] 2010-04-25

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30871074)

[作者简介] 耿雷, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, Email为 gengxile@sina.com。通讯作者刘闰男, 硕士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病防治及血管再狭窄的机理与临床研究, Email为 guinanli@hotmail.com。

group were not significantly increased compared to the control group ($P > 0.05$). There was the maximal increase in 5.0% CSE group. The VSMC in control group expressed bFGF mRNA, bFGF and PCNA protein at low levels. Increased bFGF mRNA, bFGF and PCNA protein expression were evident after 2.5% CSE treatment. Maximal increase in bFGF mRNA, bFGF and PCNA protein expression occurred after 5.0% CSE treatment. Then expression were still elevated compared with control group's after 10%, 20% CSE treatment. (2) The VSMC in control group expressed bFGF mRNA, bFGF and PCNA protein at low levels. Increased bFGF mRNA, bFGF and PCNA protein expression were evident at 4h after CSE treatment. Maximal increase in bFGF mRNA occurred at 8h while peak expression of bFGF and PCNA protein was at 12h. (3) Treatment with bFGF antibody nearly inhibited CSE-induced MTT A value, bFGF and PCNA protein expression. **Conclusion** The proliferation of VSMC increased gradually in low and middle concentrations (2.5%, 5.0% CSE group), while decreased in high and higher concentrations (10%, 20% CSE group) on the contrary. CSE maybe increased rat VSMC proliferation by high expression of bFGF.

吸烟对人类健康的危害是巨大的, 根据 WHO 2008 年全球烟草流行报告^[1], 现在每年因烟草导致的死亡达 540 万人。流行病学研究现已证实, 吸烟是冠心病的主要危险因素之一^[2], 又是死亡的主要可预防因子。有研究显示^[3]: 无论是被动还是主动通过雪茄或烟斗吸烟, 冠心病的发病风险同样增加。据统计^[3], 在美国, 每年大约 40 万以上的人死于吸烟, 其中缺血性心脏病占 35% ~ 40%。

吸烟在致动脉粥样硬化过程中能促使血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell VSMC) 分泌各种因子, 这其中主要包括碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor bFGF)。bFGF 是 1974 年, Gospodarowicz 等^[4]从牛脑垂体中分离纯化一种对成纤维细胞系 Balb/c3T3 的分裂增殖具有促进效应的多肽, 其是肝素结合生长因子家族成员之一, 在体内分布广泛。bFGF 具有多种生物学作用: 促进细胞分裂增殖、血管生成、创伤修复; 具有神经营养效应等, 其中促 VSMC 增殖是其重要作用之一^[5]。而 VSMC 增殖又是动脉粥样硬化发生、发展的关键^[6]。bFGF 在动脉粥样硬化形成过程中发挥了重要作用^[5]。

本研究应用烟草烟雾提取物 (cigarette smoke extract CSE) 刺激体外培养的大鼠 VSMC, 观察其对大鼠 VSMC 增殖的影响并应用 bFGF 抗体中和 bFGF 生物功能, 探讨 bFGF 在 CSE 刺激 VSMC 增殖中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

美国肯塔基大学烟草健康研究所生产的烟草研究用香烟 (3R4F)。大鼠主动脉血管平滑肌细胞购自 ATCC 细胞库为 A10 细胞株。胎牛血清购自 Gibco。高糖 DMEM 购自 Hyclone。增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 小鼠抗大鼠单克隆抗体购自武汉博士德生物技术有限公司。

bFGF 兔抗大鼠多克隆抗体购自博奥森生物技术有限公司。Trizol 购自 Invitrogen。逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription PCR, RT-PCR) 试剂盒购自全式金生物技术有限公司。PCR 引物合成购自宝生物工程 (大连) 有限公司。DNA 分子量标准购自大连宝生物工程 (大连) 有限公司。SP 试剂盒和 DAB 显色剂购自迈新生物技术开发有限公司。SABC 试剂盒购自博士德生物技术有限公司。

1.2 大鼠主动脉血管平滑肌细胞的培养

细胞在 37°C, 5% CO₂ 细胞培养箱中静置培养, 每 2 天用换液 1 次。当细胞长满瓶底 80% 左右时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。取第 3~8 代的细胞, 当细胞长至 70% ~ 80% 融合时进行实验。

1.3 香烟烟雾提取物的制备

参考文献 [7] 方法, 将 1 支烟草研究用香烟点燃, 其过滤嘴端接一根橡皮管, 橡皮管另一端接装有 10 mL 无菌无血清 DMEM 的玻璃瓶的入口, 玻璃瓶出口接 50 mL 注射器进行抽吸, 每次 50 mL, 持续 10 s 共 6 次, 将总共 300 mL 烟雾通入玻璃瓶中, 用 1 mol/L NaOH 调至 pH 7.4 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤得到 100% 的 CSE 原液, 30 min 之内用于实验。并且应用液相色谱法检验 100% CSE 原液中尼古丁的相对浓度, 经多次重复实验, 尼古丁浓度相对恒定。

1.4 实验分组与处理

1.4.1 最适烟草烟雾提取物浓度筛选实验 共分 5 组, 分别为正常培养细胞的对照组、低浓度、中等浓度、高浓度和过高浓度烟草烟雾提取物组, 烟草烟雾提取物其浓度分别为 0.0%、2.5%、5%、10% 和 20%。

1.4.2 5% 烟草烟雾提取物刺激不同时间的实验 共分 5 组, 分别为正常培养细胞的对照组 (即 0 h 组)、4、8、12 h 和 24 h 组。

1.4.3 碱性成纤维细胞生长因子抗体中和实验 共分 3 组, 分别为对照组 (不加任何干预)、5% CSE 组 (加终浓度为 5% CSE)、5% CSE + bFGF 抗体

组 (CSE 终浓度为 5% + 0.2 μg/L bFGF 抗体终浓度为 0.2 μg/L; CSE 与 bFGF 抗体同时加入 24 h)。

1.5 MTT 比色法

细胞传代接种于 96 孔板中,用含 10% FBS 的 DMEM 培养,长至 70% ~ 80% 融合后换不含血清的 DMEM 培养细胞 24 h 使细胞同步于 G₀ 期。首先,做最适 CSE 浓度筛选实验:加入不同浓度的 CSE (2.5%、5%、10% 和 20%),以不加 CSE 作为对照组,继续培养 24 h 其次,做 bFGF 抗体中和实验:加入 5% CSE、5% CSE + bFGF 抗体,以不加 CSE 的作为对照组,培养 24 h。向 96 孔板中每孔加入 MTT 溶液 (5 g/L) 20 μL, 37°C, 5% CO₂ 饱和湿度培养箱继续孵育 4 h 吸去孔内培养液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砷 (DMSO),振荡 10 min,在酶联免疫检测仪上选用 490 nm 波长测定各孔吸光度 (A),实验重复 3 次,取平均数。

1.6 逆转录 - 聚合酶链反应法检测

测定总 RNA 量和纯度并进行调整。逆转录和 PCR 操作步骤参照说明书进行。bFGF 的上游引物 5'-TCG TTT CAG TGC CAC ATA CCA-3',下游引物 5'-GGG AGA AGA GAG CGA CCC ACA-3',扩增片段长度为 231 bp。GAPDH 为内参,上游引物 5'-GTG CTG AGT ATG TCG TGG AG-3',下游引物 5'-TCT TCT GAG TGG CAG TGA T-3',扩增片段长度为 288 bp。25 μL 反应体系组成如下: 2 × TransFaq HiFi PCR SuperMix (12.5 μL, 上下游特异性 PCR 引物各 0.5 μL, dDNA 3 μL, 余用 ddH₂O 补足至 25 μL。bFGF 反应条件为 94°C 预变性 5 min, 93°C 变性 30 s, 56°C 退火 30 s, 72°C 延伸 60 s, 共 35 个循环,最后 72°C 延伸 10 min。GAPDH 反应条件为: 94°C 预变性 5 min, 93°C 变性 30 s, 55.1°C 退火 30 s, 72°C 延伸 60 s, 共 35 个循环,最后 72°C 延伸 10 min。取 PCR 产物 8 μL 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色,通过凝胶成像系统将各组 bFGF 的条带分别与相应的内参条带作光密度比较,以比值代表 bFGF mRNA 的水平。实验重复 3 次。

1.7 免疫细胞化学法检测碱性成纤维细胞生长因子和增殖细胞核抗原蛋白表达

细胞传代接种、培养及同步化同上。收集细胞爬片,用 PBS 洗 2 次,室温下 4% 多聚甲醛固定。一抗为 1:200 稀释的 bFGF 兔抗大鼠多克隆抗体、PCNA 小鼠抗大鼠单克隆抗体,按 SABC 和 SP 试剂盒进行操作, DAB 显色。Olympus 光学显微镜下观察并照像。bFGF 阳性表达为细胞的胞浆染成棕黄

色; PCNA 阳性表达为细胞的胞核染成棕黄色。每张片随机选取 6 个视野,用 MetaMorph Imaging system 软件分析。以平均吸光度 (A) 反映 bFGF 蛋白表达量;并计算 PCNA 细胞核阳性细胞数占细胞总数的百分比。实验重复 3 次,图像分析由操作熟练但不知情者操作。

1.8 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 17.0 软件,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 不同浓度烟草烟雾提取物对大鼠血管平滑肌细胞增殖、碱性成纤维细胞生长因子 mRNA、碱性成纤维细胞生长因子及增殖细胞核抗原蛋白表达的影响

低浓度 CSE 组血管平滑肌细胞增加,与对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。中浓度 CSE 组血管平滑肌细胞增加,与对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。10% 和 20% CSE 组血管平滑肌细胞与对照组比较,差异无显著性 (表 1)。对照组大鼠 VSMC 中有少量的 bFGF mRNA 表达。大鼠 VSMC 暴露于不同浓度 CSE 后,细胞内 bFGF mRNA 呈剂量依赖性地升高,5% 达最高,此后逐渐下降,10% 和 20% CSE 时仍显著高于对照组 ($P < 0.01$, 图 1 和表 1)。对照组大鼠 VSMC bFGF 和 PCNA 蛋白的免疫细胞化学染色呈弱阳性。不同浓度 CSE 处理后,细胞染色程度增强。图像分析显示 5% CSE 时, bFGF 和 PCNA 蛋白的平均吸光度值达最高 ($P < 0.01$),此后下降,10% 和 20% CSE 时仍高于对照组 ($P < 0.01$; 表 1)。

2.2 5% 烟草烟雾提取物刺激不同时间的实验结果

对照组大鼠 VSMC 中有少量的 bFGF mRNA 表达。大鼠 VSMC 暴露于 5% CSE 后,细胞内 bFGF mRNA 逐渐升高,8 h 达最高 ($P < 0.01$),此后逐渐下降,24 h 时仍显著高于对照组 ($P < 0.01$; 图 2 和表 2)。

对照组大鼠 VSMC bFGF 和 PCNA 蛋白的免疫细胞化学染色呈弱阳性。5% CSE 处理后,细胞染色程度增强。图像分析显示 4 h 时大鼠 VSMC 内 bFGF 蛋白的平均吸光度值高于对照组 ($P < 0.01$),12 h 平均吸光度值达最高 ($P < 0.01$),此后下降,24 h 时仍高于对照组 ($P < 0.01$; 表 2)。

表 1 不同浓度烟草烟雾提取物对大鼠血管平滑肌细胞增殖、碱性成纤维细胞生长因子 mRNA、碱性成纤维细胞生长因子及增殖细胞核抗原蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	MTT(A 值)	bFGF mRNA	bFGF 蛋白 (A 值)	PCNA 蛋白 阳性表达率
对照组	0.411 ± 0.012	0.562 ± 0.027	0.141 ± 0.007	26.0% ± 5.2%
2.5% CSE 组	0.429 ± 0.008 ^a	0.816 ± 0.005 ^b	0.161 ± 0.005 ^b	47.5% ± 8.5% ^b
5.0% CSE 组	0.442 ± 0.018 ^b	0.947 ± 0.007 ^b	0.202 ± 0.011 ^b	55.5% ± 8.1% ^b
10% CSE 组	0.426 ± 0.013	0.830 ± 0.022 ^b	0.183 ± 0.009 ^b	39.5% ± 5.0% ^b
20% CSE 组	0.410 ± 0.015	0.765 ± 0.048 ^b	0.164 ± 0.009 ^b	36.5% ± 4.3% ^b

a为 $P < 0.05$, b为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

表 2 5% 烟草烟雾提取物刺激不同时间的实验结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	bFGF mRNA	bFGF 蛋白 (A 值)	PCNA 蛋白 阳性表达率
对照组	0.545 ± 0.024	0.143 ± 0.005	25.4% ± 3.4%
4 h 组	0.675 ± 0.023 ^a	0.171 ± 0.010 ^a	38.3% ± 2.9% ^a
8 h 组	0.944 ± 0.015 ^a	0.200 ± 0.011 ^a	47.6% ± 4.7% ^a
12 h 组	0.754 ± 0.024 ^a	0.236 ± 0.010 ^a	58.8% ± 4.8% ^a
24 h 组	0.716 ± 0.013 ^a	0.205 ± 0.012 ^a	54.6% ± 7.6% ^a

a为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.3 碱性成纤维细胞生长因子抗体对大鼠血管平滑肌细胞增殖及碱性成纤维细胞生长因子和增殖细胞核抗原蛋白表达的影响

碱性成纤维细胞生长因子抗体能显著抑制 5% CSE 刺激的 VSMC 增殖及 bFGF 和 PCNA 蛋白的表达 (表 3 图 3 和图 4)。

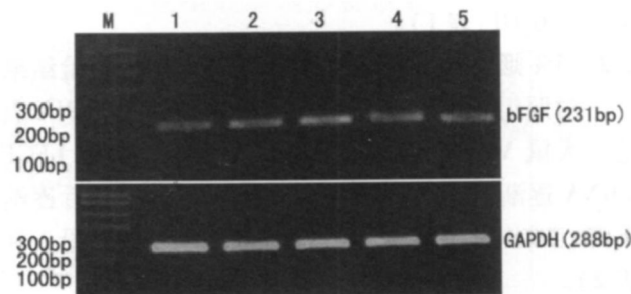


图 1 不同浓度烟草烟雾提取物对大鼠血管平滑肌细胞内碱性成纤维细胞生长因子 mRNA 表达的影响 M 为 Marker 1 为对照组, 2 为 2.5% CSE 组, 3 为 5% CSE 组, 4 为 10% CSE 组, 5 为 20% CSE 组。

表 3 碱性成纤维细胞生长因子抗体对大鼠血管平滑肌细胞增殖及碱性成纤维细胞生长因子和增殖细胞核抗原蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	MTT (A 值)	bFGF 蛋白 (A 值)	PCNA 蛋白 阳性表达率
对照组	0.412 ± 0.012	0.140 ± 0.005	26.0% ± 4.0%
5% CSE	0.444 ± 0.017 ^a	0.206 ± 0.016 ^a	53.8% ± 9.1% ^a
5% CSE + bFGF 抗体	0.411 ± 0.019 ^b	0.140 ± 0.008 ^b	28.7% ± 5.2% ^b

a为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b为 $P < 0.01$ 与 5% 烟草烟雾提取物组比较。

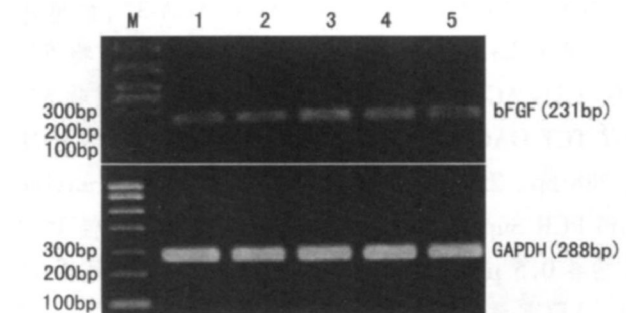


图 2 5% 烟草烟雾提取物对大鼠血管平滑肌细胞内不同时间点碱性成纤维细胞生长因子 mRNA 表达的影响 M 为 Marker 1 为对照组, 2 为 4 h 组, 3 为 8 h 组, 4 为 12 h 组, 5 为 24 h 组。

3 讨论

吸烟是促进动脉粥样硬化发生、发展及心脑血管事件发生的重要原因之一。其作用机制有很多, 如血管内皮功能紊乱、炎症和氧化应激反应、血脂代谢异常、促血栓作用、遗传因素及基质金属蛋白酶活性的调节等, 但其确切机制尚需进一步研究。

体外实验表明, 香烟尘粒对 VSMC 有明显促增殖的作用^[8]。而 VSMC 增殖是动脉粥样硬化发生机制的重要组成部分^[9-10]。在吸烟所致动脉粥样硬化发生、发展过程中, VSMC 不仅仅是作为促增殖物质和生长因子的靶细胞, 还会分泌或旁分泌一些

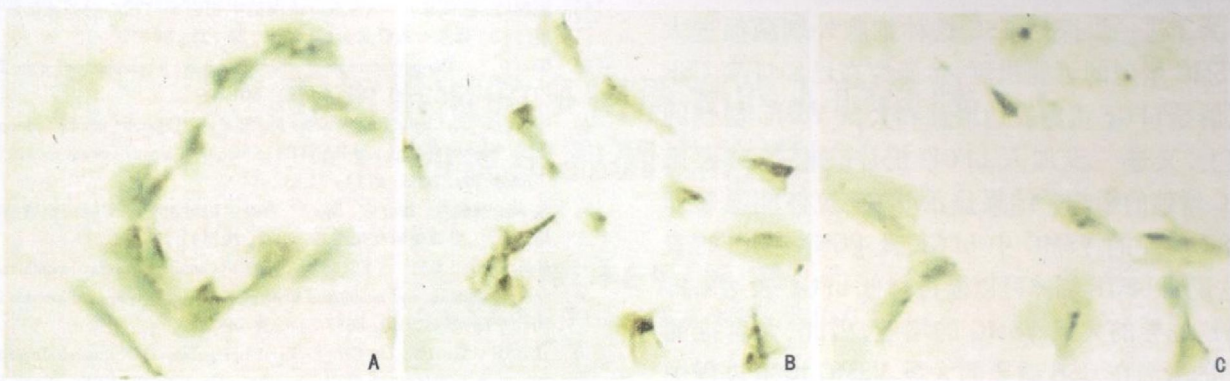


图3. 碱性成纤维细胞生长因子抗体中和实验中烟草烟雾提取物致碱性成纤维细胞生长因子蛋白表达的变化($\times 400$) A 为对照组, B 为 5% CSE 刺激组, C 为 5% CSE 和 bFGF 抗体共同刺激组。



图4. 碱性成纤维细胞生长因子抗体中和实验中烟草烟雾提取物致增殖细胞核抗原蛋白表达的变化($\times 100$) A 为对照组, B 为 5% CSE 刺激组, C 为 5% CSE 和 bFGF 抗体共同刺激组。

因子如 bFGF、PDGF、ET-1 等。有实验证实,尼古丁是香烟中一种重要成分,其能刺激牛平滑肌细胞中 bFGF 的释放增加^[11]。

本实验结果显示, CSE 在低浓度、中浓度组中能够明显促进血管平滑肌细胞增殖及 bFGF、PCNA 蛋白的大量表达。而在高浓度和过高浓度组(10% 和 20% CSE)组中 bFGF 及 PCNA 蛋白表达低于低浓度和中浓度组这可能与高浓度组的细胞毒性有关。这与 Carty 等^[12]发现的低浓度尼古丁(10^{-7} mol/L 和 10^{-8} mol/L)时可促进人血管平滑肌细胞增殖,而高浓度尼古丁对细胞有毒性作用的结论相类似。同时考虑到, CSE 中除主要研究的有害物质尼古丁外,还含有 NO、CO、丙烯醛等多种物质。不同 CSE 制备方法中,不同组分对 VSMC 作用及程度不同,其作用机制复杂,有待我们的进一步深入研究。

MTT 是一种淡黄色唑氮盐,是活细胞线粒体脱氢酶的底物,经酶催化还原为蓝紫色甲结晶-甲贍,该物质溶解后,用酶标仪可对其进行检测。甲贍的

产生量与细胞的功能状态紧密相关,活化的细胞要比静止的细胞产生更多的甲贍。研究表明,受促有丝分裂素刺激的细胞,单个细胞产生甲贍的量较静止时显著增加^[13]。而 PCNA 又称周期蛋白,是一种与细胞增殖周期有关的核内糖蛋白,是 DNA 复制的必须成分,其表达与细胞增殖活性有关^[14]。以上两种指标已成为评价细胞增殖状态的客观指标。所以,本文应用了 MTT(A 值)和 PCNA 蛋白的表达来检测细胞增殖。

在 CSE 的高浓度和过高浓度组中抑制血管平滑肌细胞增殖, bFGF、PCNA 蛋白表达低于低浓度、中浓度组,其促细胞增殖的趋势减弱;但是,在低浓度、中浓度组中促进血管平滑肌细胞增殖及 bFGF、PCNA 蛋白的大量表达,仍提示了 CSE 能够促进 VSMC 中 PCNA 及 bFGF 蛋白的表达,从而使细胞增殖。这与林俊岭^[15]发现的 CSE 参与大鼠气道平滑肌细胞增殖及 Carty 等^[16]发现的尼古丁能诱导体外培养的人平滑肌细胞分泌 bFGF 和 MMP 的实验结

果相似。

为了进一步探讨 CSE 这种细胞外刺激促进大鼠 VSMC 增殖的可能机制, 本研究在已经证实 CSE 可以诱导 bFGF 蛋白表达增加和大鼠 VSMC 增殖的基础上, 又进一步加入 bFGF 抗体观察其对大鼠 VSMC 增殖的影响。结果显示 bFGF 抗体能显著抑制 CSE 诱导的 VSMC 中 bFGF 及 PCNA 蛋白的表达, 这说明 bFGF 抗体可以通过降低 bFGF 表达来抑制 CSE 诱导的大鼠 VSMC 的增殖, 因此, 作者推测 bFGF 的激活在 CSE 诱导的大鼠 VSMC 增殖过程中可能起着主要的介导作用。

总之, 本研究证实 CSE 能够刺激 VSMC 中 bFGF 及 PCNA 表达对大鼠 VSMC 有明显的促增殖作用。这种促增殖作用, 在一定范围内与 CSE 浓度有关; 且可能与 bFGF 的表达密切相关。本实验为研究吸烟与动脉粥样硬化发生发展的相关性提供了一定的理论依据。

[参考文献]

- [1] WHO. WHO report on the global tobacco epidemic[M]. Geneva WHO, 2008 8
- [2] 张远征. 冠心病发病危险因素研究现状[J]. 第四军医大学学报, 2009 30(23): 2 888-891.
- [3] He J, Vupputuri S, Allen K, et al. Passive smoking and the risk of coronary heart disease: A meta-analysis of epidemiologic studies [J]. *N Engl J Med*. 1999 340(12): 920-926
- [4] Gospodarowicz D, Jones KL, Sato G. Purification of a growth factor for ovarian cells from bovine pituitary glands [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974 71(6): 2 295-299
- [5] 陈湘琦, 陈良龙. 碱性成纤维细胞生长因子与冠心病关系的研究进展[J]. 临床心血管病杂志, 2008 24(2): 84-87.
- [6] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis—a perspective for the 1990s [J]. *Nature* 1993 362(6 423): 801-809
- [7] Olinanns U, Chung KF, Walters M, et al. Cigarette smoke induces IL-8 but inhibits cotaxin and RANTES release from airway smooth muscle [J]. *Respir Res* 2005 6(1): 74-83
- [8] 张晓, 胡晓兰, 徐仓宝, 等. 香烟尘粒对血管平滑肌细胞增殖的作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2002 10(4): 294-296
- [9] Han W, Liu GN. EGR-1 decoy ODNs inhibit vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia of balloon-injured arteries in rat [J]. *Life Sci* 2010 86(7-8): 234-243
- [10] Liu QF, Yu HW, Liu GN. Egr-1 upregulates OPN through direct binding to its promoter and OPN upregulates Egr-1 via the ERK pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2009 332(1-2): 77-84
- [11] Cucina A, Sapienza P, Corvino V, et al. Nicotine-induced smooth muscle cell proliferation is mediated through bFGF and TGF-β1 [J]. *Surgery*; 2000 127(3): 316-322
- [12] Carty CS, Hurbal M, Marsan BU, et al. Nicotine and its metabolite cotinine are mitogenic for human vascular smooth muscle cells [J]. *J Vasc Surg*. 1997 25(4): 682-688
- [13] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *J Immunol Methods* 1983 65(1-2): 55-63
- [14] Paunesku T, Mital S, Protic M, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome [J]. *Int J Radiat Biol* 2001 77(10): 1 007-021.
- [15] 林俊岭, 徐永健, 张珍祥, 等. 香烟烟雾增加支气管哮喘大鼠气道平滑肌细胞的增殖表达 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005 28(8): 565-566
- [16] Carty CS, Solway PD, Kayastha S, et al. Nicotine and cotinine stimulate secretion of basic fibroblast growth factor and affect expression of matrix metalloproteinases in cultured human smooth muscle cells [J]. *J Vasc Surg*. 1996 24(6): 927-935

(此文编辑 李小玲)