

# 内皮素对大鼠主动脉血管平滑肌细胞骨桥蛋白表达的影响

胡 涛, 贾国良, 王海昌, 郭文怡, 李 寰, 曹燕杰, 王晓燕

(中国人民解放军第四军医大学西京医院心内科, 陕西省西安市 710032)

[关键词] 医学细胞生物学; 内皮素促进骨桥蛋白表达; 逆转录聚合酶链反应; 内皮素 1; 平滑肌细胞; 骨桥蛋白; 基因表达

[摘要] 目的 观察内皮素 1 对培养的大鼠主动脉血管平滑肌细胞骨桥蛋白表达的影响。方法 用含 10% 小牛血清 DMEM 培养基体外培养大鼠主动脉血管平滑肌细胞, 随机分为对照组、不同浓度 ( $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  和  $10^{-8}$  mol/L) 及时间 (6 h、12 h、24 h 和 48 h) 干预组, 应用逆转录聚合酶链反应及 Western blot 技术结合吸光度扫描分析, 观察内皮素 1 对血管平滑肌细胞骨桥蛋白表达的影响。结果 不同浓度内皮素 1 均明显刺激血管平滑肌细胞骨桥蛋白 mRNA 和蛋白的表达, 但无剂量依赖性促进作用; 除 6 h 干预组与对照组相比差异无显著性外, 其他各不同时间干预组 (12 h、24 h 和 48 h) 均明显刺激血管平滑肌细胞骨桥蛋白 mRNA 和蛋白的表达, 且具有时间依赖性。结论 内皮素 1 能促进血管平滑肌细胞骨桥蛋白的表达。

[中图分类号]

[文献标识码] A

## Effect of Endothelin-1 on Expression of Osteopontin in Rat Aortic Vascular Smooth Muscle Cell

HU Tao, JIA Guo-Liang, WANG Hai-Chang, GUO Wen-Yi, LI Huan, CAO Yan-Jie, and WANG Xiao-Yan

(Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xian 710032, China)

[KEY WORDS] Endothelin-1; Smooth Muscle Cell; Osteopontin; Gene Expression; Protein Synthesis; Promotion

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of endothelin-1 (ET-1) on osteopontin expression of rat aortic vascular smooth muscle cell (VSMC). **Methods** Rat aortic vascular smooth muscle cell were cultured in vitro with DMEM and 10 percent calf plasma. The cell were incubated with different concentration of ET-1 for different hours, then RT-PCR and Western blotting analysis were used to observe the effect of  $H_2O_2$  on osteopontin expression of rat VSMC. **Results** Different concentration of ET-1 could obviously induce gene expression and protein synthesis of osteopontin, without exhibiting dose-dependent promotion effect. Cell incubated with ET-1 for different hours also obviously induce gene expression and protein synthesis of osteopontin except 6 h, and exhibited time-dependence. **Conclusions** These results demonstrate that ET-1 could stimulate osteopontin expression of rat VSMC.

正常情况下, 动脉中膜的血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 处于分化状态, 呈收缩表型, 没有增殖和迁移能力, 在各种刺激因素作用下, VSMC 可由分化状态转变为未分化状态, 从收缩表型转变为合成表型, 并从中膜迁移至内膜进行大量增殖, 在动脉粥样硬化及经皮冠状动脉介入治疗 (percutaneous coronary intervention, PCI) 术后再狭窄 (restenosis, RS) 的发生发展过程中起着重要作用<sup>[1]</sup>。两种表型的 VSMC 在基因表达上存在明显差异, 差异显示技术证明骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 是 VSMC 表型转化的标志基因<sup>[2]</sup>。内皮素 (endothelin,

ET) 系统在许多血管病变的病理生理过程中起着重要的作用, 内皮素 1 通过激活丝裂素活化蛋白激酶移位进入核内激活一系列与生长相关的基因表达, 引起 VSMC 迁移和增殖, 但其确切作用机制不明<sup>[3]</sup>。Kitano 等<sup>[4]</sup>发现内皮素 1 基因缺损小鼠 OPN 表达减少, Suga 等<sup>[5]</sup>发现低钾血症诱导的肾损伤小鼠内皮素 1 水平增高同时 OPN 基因表达增高, 提示内皮素 1 和 OPN 基因表达之间可能具有某种关系。内皮素 1 是否通过激活 OPN 的表达从而导致 VSMC 迁移和增殖, 国内外尚未见报道。本实验以培养的大鼠主动脉 VSMC 为对象, 研究内皮素 1 对 OPN 基因和蛋白表达的影响, 以期对其作用机制做有益的探讨。

[收稿日期] 2005-02-26

[修回日期] 2005-10-20

[作者简介] 胡涛, 博士, 主治医师, 讲师, 从事心血管病诊疗, 联系电话为 029-83375183, E-mail 为 HUTAO74@Fmmu.edu.cn。贾国良, 主任医师, 教授, 从事心血管病诊疗, 联系电话为 029-83375760。王海昌, 博士, 主任医师, 教授, 从事心血管病诊疗, 联系电话为 029-83373469。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Trizol, AMV 逆转录酶, TaqDNA 聚合酶, dNTP

(Promega 公司); 内皮素 1 (Sigma 公司); PCR 引物 (上海生工生物工程公司); PCR Marker (洛阳华美生物工程公司); 琼脂糖 (GibcoBRL 公司); DMEM 干粉细胞培养基 (Hyclone 公司); 山羊抗大鼠 OPN 单抗 (Santa Cruz 公司); HRP 结合兔抗山羊 IgG; (武汉博士德生物工程公司); ECL 试剂盒 (Amersham 公司); 其它试剂均为进口分装或国产分析纯。

## 1.2 大鼠主动脉平滑肌细胞的体外培养

纯种雄性 SD 大鼠 (第四军医大学实验动物中心提供), 200~250 g, 250 g/L 乌拉坦麻醉 (每千克体重 1.2 g), 无菌条件下取出胸腹主动脉, 按组织贴块法进行培养, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。光镜下观察细胞呈典型的峰-谷状表现, 经肌动蛋白抗体免疫组织化学鉴定后, 证实为 VSMC, 实验用 4~6 代细胞。

## 1.3 细胞分组及 RNA 提取

取同代对数生长期细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 制成单细胞悬液, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^8/L$ , 将细胞接种于 6 孔培养板中, 3 孔为 1 组, 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基在  $CO_2$  培养箱静置培养 48 h, 加入不同浓度内皮素 1 ( $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  和  $10^{-8}$  mol/L) 继续培养 24 h, 其中内皮素 1 ( $10^{-7}$  mol/L) 干预的细胞按不同干预时间再分为 6 h、12 h、24 h 和 48 h 组。培养结束后, 按常规方法提取 RNA。

## 1.4 逆转录聚合酶链反应

用于 OPN 基因序列扩增的引物序列为: 上游 5'-CAA GGA GTA TAA GCA GAG GGC CA -3', 下游 5'-ACT CTT AGG GTC TAG GAC TAG CTT GT -3', 扩增片段长度 200 bp;  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 引物序列为: 上游 5'-GGT ATG GGT CAG AAG GAC TCC-3', 下游 5'-TGA TCT TCA TGG TGC TAG GAG CG-3'。扩增片段长度 846 bp; 引物合成由上海申友生物技术有限责任公司完成。按常规逆转录聚合酶链反应方法进行扩增反应。取扩增产物 20  $\mu$ L, 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 采用 Alpha Innotech Corporation & Analysis system 凝胶成像系统进行检测, 并用 Labworks 软件对各阳性条带的密度进行测定。以 OPN 与  $\beta$ -actin 电泳条带的吸光度比值作为 OPN mRNA 相对表达量, 每次扩增过程中均设阴性对照防止产生非特异性的扩增产物。

## 1.5 Western Blot 分析

按常规方法提取蛋白样品, 配备 10% 分离胶与 6% 浓缩胶。取样品 20  $\mu$ L 加样, 按常规 Western Blot 方法电泳转膜。转膜后用含脱脂奶粉封闭液封闭, 将一抗即山羊抗大鼠 OPN 单抗按 1:200 稀释, 膜置

于一抗, 37℃ 温箱平放温育 2 h。将二抗即生物素标记的兔抗山羊 IgG 按 1:100 稀释, 膜置于二抗, 37℃ 温箱平放温育 30 min。取出膜, 用 ECL 试剂盒在 Hyperfilm 上显示蛋白条带。采用 Alpha Innotech Corporation & Analysis system 凝胶成像系统进行检测, 并用 Labworks 软件对各阳性条带密度进行测定。

## 1.6 统计学处理

统计数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 数据处理应用 SPSS12.0 统计软件进行两组均数  $t$  检验和多组均数的单因素方差分析。  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

# 2 结果

## 2.1 不同浓度内皮素 1 对血管平滑肌细胞骨桥蛋白 mRNA 表达的影响

对照组与不同浓度干预组均检测到较高密度的 OPN mRNA 阳性条带 (图 1, Figure 1), 各个阳性条带的位置与预期的 OPN PCR 产物的大小相符。用 Labworks 软件对各阳性条带的密度进行测量, 结果发现对照组细胞表达一定量的 OPN 基因 (与  $\beta$ -actin 电泳条带的吸光度比值为  $0.654 \pm 0.048$ ), 不同浓度 ( $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  和  $10^{-8}$  mol/L) 内皮素 1 组吸光度比值 (分别为  $1.204 \pm 0.142$ 、 $1.157 \pm 0.053$ 、 $1.193 \pm 0.048$  和  $0.997 \pm 0.036$ ) 与对照组相比差异均有显著性 ( $P < 0.01$ ), 但各干预组之间相比差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。取浓度为  $10^{-7}$  mol/L 内皮素 1 进一步按不同时间段进行干预。

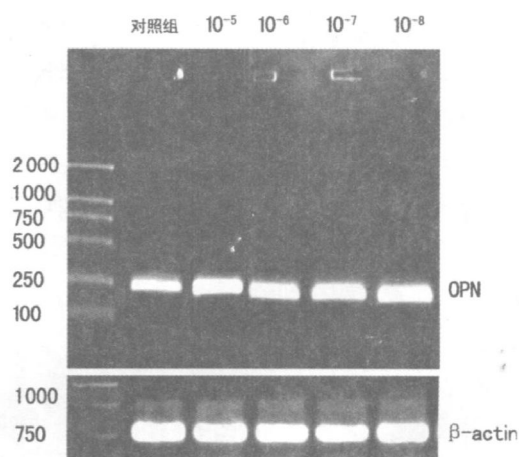


图 1. 不同浓度内皮素 1 对血管平滑肌细胞骨桥蛋白 mRNA 表达的影响

Figure 1. A representative 3% agarose gel electrophoresis of PCR-amplified products of OPN and  $\beta$ -actin from different groups of concentration

## 2.2 不同干预时间对血管平滑肌细胞骨桥蛋白 mRNA 表达的影响

对照组与各不同干预时间组均检测到较高密度的 OPN mRNA 的阳性条带 (图 2, Figure 2), 各个阳性条带的位置与预期的 OPN PCR 产物的大小相符。用 Labworks 软件对各阳性条带的密度进行测量, 结果发现对照组细胞表达一定量的 OPN 基因 (与  $\beta$ -actin 电泳条带的吸光度比值为  $0.654 \pm 0.048$ ), 除 6 h 干预组 ( $0.724 \pm 0.081$ ) 与对照组相比差异无显著性外, 不同时间干预组 (12 h、24 h 和 48 h) 吸光度比值 (分别为  $0.887 \pm 0.053$ 、 $1.193 \pm 0.048$  和  $1.564 \pm 0.029$ ) 与对照组相比差异均有显著性 ( $P < 0.01$ ), 且各时间干预组之间相比差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 说明内皮素 1 的刺激作用具有时间依赖性, 随时间延长, 刺激作用增强。

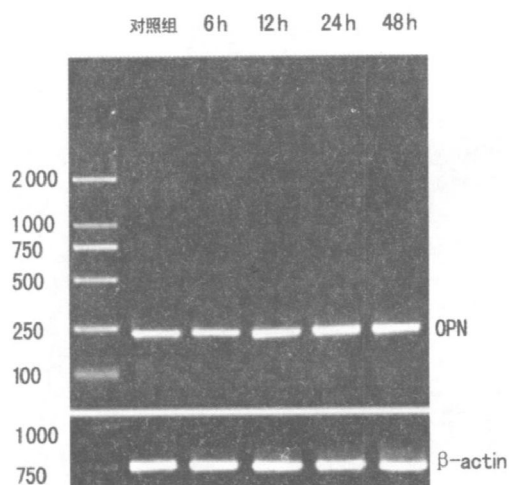


图 2. 内皮素 1 不同干预时间对血管平滑肌细胞骨桥蛋白 mRNA 表达的影响

Figure 2. A representative 3% agarose gel electrophoresis of PCR-amplified products of OPN and  $\beta$ -actin from different groups of time

## 2.3 不同浓度内皮素 1 对血管平滑肌细胞骨桥蛋白表达的影响

Western blot 结果发现对照组与不同浓度干预组均表达一定量的 OPN 蛋白 (图 3, Figure 3), 用 Labworks 软件对蛋白吸光度进行定量分析, 结果发现对照组细胞表达一定量的 OPN, 各内皮素 1 组均较对照组增强, 与对照组比较差异显著 (分别为  $49\ 015 \pm 205$ 、 $51\ 459 \pm 297$ 、 $53\ 659 \pm 308$ 、 $55\ 572 \pm 326$  比  $30\ 623 \pm 224$ ,  $P < 0.05$ )。不同浓度干预组之间组间分析显示差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

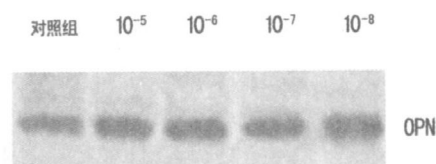


图 3. 不同浓度内皮素 1 对血管平滑肌细胞骨桥蛋白表达的影响

Figure 3. Western blot of the OPN from different groups of concentration

## 2.4 不同干预时间对血管平滑肌细胞骨桥蛋白表达的影响

对照组与不同浓度干预组均表达一定量的 OPN (图 4, Figure 4), 用 Labworks 软件对蛋白吸光度进行定量分析, 结果发现对照组细胞表达一定量的 OPN, 除 6 h 干预组 ( $31\ 825 \pm 228$ ) 与对照组相比差异无显著性外, 各不同时间干预组 (12 h、24 h 和 48 h) 与对照组比较差异显著 ( $39\ 459 \pm 297$ 、 $51\ 364 \pm 331$ 、 $68\ 459 \pm 297$  比  $30\ 623 \pm 224$ ,  $P < 0.01$ ), 且各时间干预组之间相比差异有显著性 ( $P < 0.05$ ), 说明内皮素 1 的刺激作用具有时间依赖性, 随时间延长刺激作用增强。

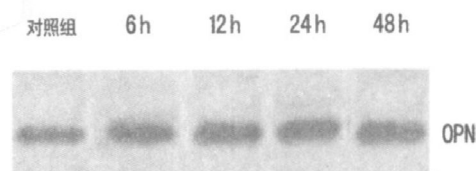


图 4. 内皮素 1 不同干预时间对血管平滑肌细胞骨桥蛋白表达的影响

Figure 4. Western blot of the OPN from different groups of time

## 3 讨论

人和动物的 RS 模型均表明, VSMC 合成表型是动脉粥样硬化及新生内膜形成的标志<sup>[6]</sup>。正常成熟的 VSMC 是一种高度特异化的细胞, 从出生到成年经历合成型 (胚胎型)、部分合成表型 (中间型) 及收缩型等变化, 当 VSMC 为收缩型时, 细胞生长代谢活力较低, 对外界各种有丝分裂原不能发生有效反应。只有经过向合成型转化的 VSMC 才能对各种有丝分裂原起反应而活跃增殖, 因此向合成型转化是 VSMC 迁移和增殖的先决条件。

骨桥蛋白是一种酸性糖蛋白,最早是作为一种基质蛋白发现于骨骼中,随后 OPN 在心血管系统中的作用也逐渐被证实<sup>[7]</sup>。OPN 的表达能够促使 VSMC 由收缩型向合成型转换,促发其迁移和增殖;同时 OPN 作为多种细胞的粘附性基质,能够促进包括内皮细胞、VSMC、巨噬细胞在内的多种细胞与细胞外基质发生粘附,为新生内膜的形成奠定基础。研究表明众多涉及动脉粥样硬化和 PCI 术后 RS 的生长因子和细胞因子均可促进 OPN 表达,进而引起的 VSMC 粘附、迁移及增殖,最终导致动脉粥样硬化和 PCI 术后的 RS<sup>[8,9]</sup>。

内皮细胞是一种活跃的内分泌器官,能合成和分泌多种具有不同功能的血管活性物质如一氧化氮、内皮素 1 和血管紧张素 $\text{Ang}$ 等,一氧化氮与内皮素 1 具有相互拮抗的作用,一氧化氮引起血管扩张,抑制 VSMC 迁移和增殖,而内皮素 1 作用相反。生理状态下,一氧化氮与内皮素 1 处于平衡状态,当内皮细胞受损功能失调时,平衡被打破,导致白细胞、血小板粘附、血栓形成和 VSMC 异常增殖,是启动和促进 RS 的重要原因<sup>[10]</sup>。

本实验发现内皮素 1 能刺激 VSMC OPN mRNA 和蛋白表达,可能与其促进 VSMC 迁移和增殖的作用机制密切相关;同时本实验发现内皮素 1 对 VSMC OPN 表达的刺激作用具有时间依赖性,随时间延长刺激作用增强,为临床抗 ET 药物的应用方式提供

了新的思路。

#### [参考文献]

- [1] Gerald P, Sirois MG, Bernatchez PN, Tanguay JF. Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (10): 1585-590
- [2] Bidder M, Shao JS, Charlton-Kachigian N. Osteopontin transcription in aortic vascular smooth muscle Cell is controlled by glucose-regulated upstream stimulatory factor and activator protein 1 activities. *J Biol Chem*, 2002, **277** (46): 44485-496
- [3] Wolf SC, Sauter G, Risler T, Brehm BR. Effects of combined endothelin and angiotensin II antagonism on growth factor-induced proliferation of vascular smooth muscle Cell isolated from uremic rats. *Ren Fail*, 2005, **27** (4): 465-474
- [4] Kitano Y, Kurihara H, Kurihara Y, Maemura K, Ryo Y, Yazaki Y, et al. Gene expression of bone matrix proteins and endothelin receptors in endothelin 1-deficient mice revealed by in situ hybridization. *J Bone Miner Res*, 1998, **13** (2): 237-244
- [5] Suga S, Yasui N, Yoshihara F, Horio T, Kawano Y, Kangawa K, Johnson RJ. Endothelin A receptor blockade and endothelin B receptor blockade improve hypokalemic nephropathy by different mechanisms. *J Am Soc Nephrol*, 2003, **14** (2): 397-406
- [6] Aikawa M, Rabkin E, Voglic SJ, Shing H, Nagai R, Schoen FJ, et al. Lipid lowering promotes accumulation of mature smooth muscle Cell expressing smooth muscle myosin heavy chain isoforms in rabbit atheroma. *Circ Res*, 1998, **83**: 1015-1026
- [7] 杨淑莉, 韩梅, 温进坤. 骨桥蛋白与心血管疾病. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (4): 371-373
- [8] Veinot JP, Srivatsa S, Carlson P. Beta3 integrin a promiscuous integrin involved in vascular pathology. *Can J Cardiol*, 1999, **15** (7): 762-770
- [9] 石纓, 温进坤. 新生小牛血清、碱性成纤维细胞生长因子和肝素对大鼠血管平滑肌细胞骨桥蛋白基因表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (1): 1-3
- [10] Piatti P, Monti LD. Insulin resistance, hyperleptinemia and endothelial dysfunction in coronary restenosis. *Curr Opin Pharmacol*, 2005, **5** (2): 160-164

(此文编辑 朱雯霞)