

d-尼古丁对血管平滑肌细胞迁移的影响

叶丽虹* 赵铁军 张晓东* 李 胜¹

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要 为了在分子水平上揭示吸烟导致动脉粥样硬化的机制, 探讨了烟草致病的主要成分 d-尼古丁对豚鼠大脑基底动脉血管平滑肌细胞 GbaSM-4 迁移作用的影响。应用 Boyden 小室实验发现, d-尼古丁具有促进 GbaSM-4 细胞迁移的作用。免疫荧光染色显示, 在 d-尼古丁作用下有 GbaSM-4 细胞伪足内肌动蛋白表达和分布增加的现象。为了进一步阐明 d-尼古丁促进平滑肌细胞迁移作用的分子机制, 应用 RT-PCR 方法检测到在 GbaSM-4 细胞内有 $\alpha 7$ 型烟碱乙酰胆碱受体的表达。应用烟碱乙酰胆碱受体的特异性抑制剂甲基牛扁碱和肌肉收缩的关键酶——肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)抑制剂 ML-9 作用 GbaSM-4 细胞后, 发现 d-尼古丁对 GbaSM-4 细胞的诱导迁移作用被明显的抑制。采用 RNA 干扰技术, 成功地使 GbaSM-4 细胞内 MLCK 的表达水平下调, 观察到 d-尼古丁对 GbaSM-4 细胞的诱导迁移作用也被明显的抑制。上述研究结果表明, d-尼古丁以趋化因子的作用促进血管平滑肌细胞迁移, 其分子机制可能与 $\alpha 7$ 型烟碱乙酰胆碱受体和 MLCK 等因素有关, 这一发现为揭示吸烟导致动脉粥样硬化提供了实验依据。

关键词 d-尼古丁; 血管平滑肌细胞; 细胞迁移; 烟碱乙酰胆碱受体; 肌球蛋白轻链激酶

吸烟是导致心血管疾病的主要因素之一, 与动脉粥样硬化的形成具有密切的关系。然而, 吸烟引起动脉粥样硬化的机制目前尚不清楚。尼古丁是烟草致病的主要成分之一^[1]。研究显示, 尼古丁能够诱导血管平滑肌细胞释放生长因子, 从而导致血管平滑肌细胞增生^[2]。最近的研究结果表明, 动脉粥样硬化的形成和发展是血管平滑肌细胞从血管中层向血管内膜的迁移所引起的^[2]。本研究应用分子生物学等手段在分子水平上探讨了尼古丁对血管平滑肌细胞迁移的影响, 旨在进一步从分子水平上揭示吸烟与动脉粥样硬化发病之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

Boyden 小室型号为 Neuro Probe MBC96 型趋化小室(Neuro Probe 公司产品); d-尼古丁由日本戒烟财团提供; $\alpha 7$ 型烟碱乙酰胆碱受体(nAChR)抑制剂甲基牛扁碱(methyllycaconitine), 鼠抗肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK) 20 kDa 肌球蛋白轻链的单克隆抗体 K36 和 MLC20 单克隆抗体 MY21 购于 Sigma 公司; 使沉默者小 RNA 干扰(Silencer siRNA)试剂盒和从细胞到互补 DNA(Cells-

to-cDNA II)试剂盒购于 Ambion 公司; 优势 2 多聚酶链反应酶系统(Advantage 2 PCR Enzyme System)试剂盒为 BD 生物科学公司产品; 小牛血清为 Gibco BRL 公司产品。

1.2 细胞培养

平滑肌细胞 GbaSM-4, 来源于豚鼠大脑基底动脉^[3], 由日本慈惠医科大学医学部惠赠。GbaSM-4 细胞用含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养基, 在 37 °C、含有 5% CO₂ 的二氧化碳培养箱中培养。

1.3 Boyden 小室实验

采用改良的 Boyden 小室法观察细胞迁移情况, 取对数生长期的 GbaSM-4 细胞(第 3~7 代)进行实验。将 GbaSM-4 细胞消化后以 2×10^5 个/ml 的密度在无血清、含 0.5% 小牛血清白蛋白的 DMEM 培养基中培养。取单细胞悬液 50 μ l, 分别加入 Boyden 小室的上室, 取 450 μ l 含有不同浓度 d-尼古丁(6×10^{-8} ~ 6×10^{-4} mol/L)的 DMEM 培养基, 加入 Boyden 小室的下室。上下两室以预先包被 I 型胶原的聚碳

收稿日期: 2004-11-29 接受日期: 2005-04-07

国家自然科学基金资助项目(No.30170203)

¹ 现地址: 日本国群馬大学医学部

* 通讯作者。Tel: 022-23506830, Fax: 022-23501385, E-mail:

yelihong@nankai.edu.cn

酸酯微孔滤膜相隔。将 Boyden 小室置于 37 °C 含 5%CO₂ 的培养箱中培养 10 h。取出 Boyden 小室内的微孔滤膜,用甲醇将迁移至微孔滤膜下层的细胞固定,进行 Giemsa 染色。在显微镜下随机选择视野,计数膜上不同层次的细胞数目。在抑制剂实验中,采用不同浓度的烟碱乙酰胆碱受体特异性抑制剂甲基牛扁碱预处理细胞 1 h。在 Boyden 上下小室中,均加入相同浓度的抑制剂。将本实验重复 3 次,结果取平均数,计算标准差,进行 *t* 检验统计分析。

1.4 免疫印迹

将培养的 GbaSM-4 细胞用预冷的生理盐水洗 3 次,加入 100 μl 高盐裂解液(1 mol/L Tris, 5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L EDTA, 20% Triton X-100, 10% 脱氧胆酸),采用 Bradford 法测定细胞裂解液中蛋白质浓度^[4]。应用 SDS 凝胶电泳,经湿转法将蛋白质转移至 PVDF 膜,用抗 130-kDa、抗 210-kDa 两种亚型的 MLCK 单克隆抗体和 ECL 显示系统,检测细胞内 MLCK 的表达水平。

1.5 RNA 干扰

根据豚鼠细胞 MLCK 的保守序列设计相应的 siRNA。应用使沉默者小 RNA 干扰构建试剂盒化学合成双链 dsRNA。有义链序列为 5'-AATGTCGTA-CAGGTCAGATACCCTGTCTC-3',反义链序列为 5'-AAGTATCTGACCTGTACGACACCTG TCTC-3'。将合成的 dsRNA 转染 GbaSM-4 细胞。转染 48 h 后,用免疫印迹法检测细胞内 MLCK 表达水平的变化。设经加任何处理和未加 RNA 干扰片段的 GbaSM-4 细胞为阴性对照。

1.6 RT-PCR

使用从细胞到互补 DNA 试剂盒提取 GbaSM-4 细胞的总 RNA。根据多种哺乳动物 α7 型烟碱乙酰胆碱受体基因保守序列设计 PCR 引物。引物序列分别为:上游引物 5'-GAGAAGAACCAAGTTTT-AACCACCAA-3',下游引物 5'-GACCAGGAC-CCAACTTCAGTTTGCA-3'。PCR 操作步骤按优势 2 多聚酶链反应酶系统试剂盒操作说明进行。PCR 产物用 0.9% 琼脂糖电泳检测,目的片断为 317 bp。试剂盒中提供 cDNA 片段(147 bp)为阳性对照。

1.7 免疫荧光染色

在细胞培养六孔板的盖玻片上接种密度为 1 × 10⁵ 个/孔细胞,过夜培养。24 h 后用 6 × 10⁻⁶ mol/L d-尼古丁处理细胞 2 h。然后,在 4 °C 用甲醛固定

细胞 15 min,用 PBS 洗 5 min。免疫荧光染色方法按文献报道方法操作^[5]。在 BX41 Olympus 荧光显微镜下观察染色结果。

2 结果

2.1 尼古丁促进血管平滑肌细胞的迁移

根据血浆中尼古丁的生理浓度范围,采用浓度为 6 × 10⁻⁸~6 × 10⁻⁴ mol/L 的 d-尼古丁作为趋化因子进行 Boyden 小室实验,旨在探讨尼古丁对于平滑肌细胞迁移的影响。结果显示,与对照组相比,6 × 10⁻⁷ mol/L 的 d-尼古丁可明显促进 GbaSM-4 细胞的迁移(*P*<0.05);当 d-尼古丁浓度为 6 × 10⁻⁶ mol/L 时,其促进迁移的作用最为明显(*P*<0.01);但是当 d-尼古丁浓度大于 6 × 10⁻⁵ mol/L 时,其促进细胞迁移的作用逐渐减弱(图 1A)。当 Boyden 小室的上层用对应下层的 d-尼古丁浓度的培养基预先培养细胞 72 h 时,发现 6 × 10⁻⁸ mol/L 浓度的 d-尼古丁可明显地促进 GbaSM-4 细胞的迁移,在 6 × 10⁻⁶ mol/L 及 6 × 10⁻⁷ mol/L 的浓度下,其促进 GbaSM-4 细胞迁移的效果极为显著(*P*<0.01)(图 1B)。上述实验表明,d-尼古丁促进细胞迁移的最适浓度为 6 × 10⁻⁶ mol/L,处理细胞时间为 2 h。然后,应用 FITC 标记的鬼笔环肽(phalloidin)进行免疫荧光染色,检测 GbaSM-4 细胞内肌动蛋白的表达和分布情况^[5]。结果显示,在 GbaSM-4 细胞中呈活跃迁移的区域肌动蛋白为强阳性反应(图 1C)。按上述方法延长处理时间为 10 h,获得了相同的实验结果(图略)。

2.2 烟碱乙酰胆碱受体与尼古丁促进血管平滑肌细胞迁移的关系

运用 RT-PCR 方法在 GbaSM-4 细胞中检测到了 α7 型烟碱乙酰胆碱受体 mRNA 的表达,为 317 bp(图 2A)。用 α7 型烟碱乙酰胆碱受体的特异性抑制剂甲基牛扁碱^[6]预处理细胞 1 h 后,观察 6 × 10⁻⁶ mol/L 的 d-尼古丁对细胞迁移作用的影响。结果发现,当甲基牛扁碱的作用浓度达到 1 × 10⁻⁸ mol/L 和 2 × 10⁻⁸ mol/L 时,d-尼古丁诱导的促进细胞迁移作用受到显著的抑制(*P*<0.01)(图 2B)。

2.3 肌球蛋白轻链激酶在尼古丁刺激细胞迁移中的作用

应用 Ambion 公司的试剂盒,人工化学合成 21 bp 针对 MLCK 的双链小干扰 RNA 片断。将 dsRNA 转染至 GbaSM-4 细胞进行 MLCK 的 RNA 干扰,免疫印迹检测结果显示,细胞内 MLCK 的表达水平明

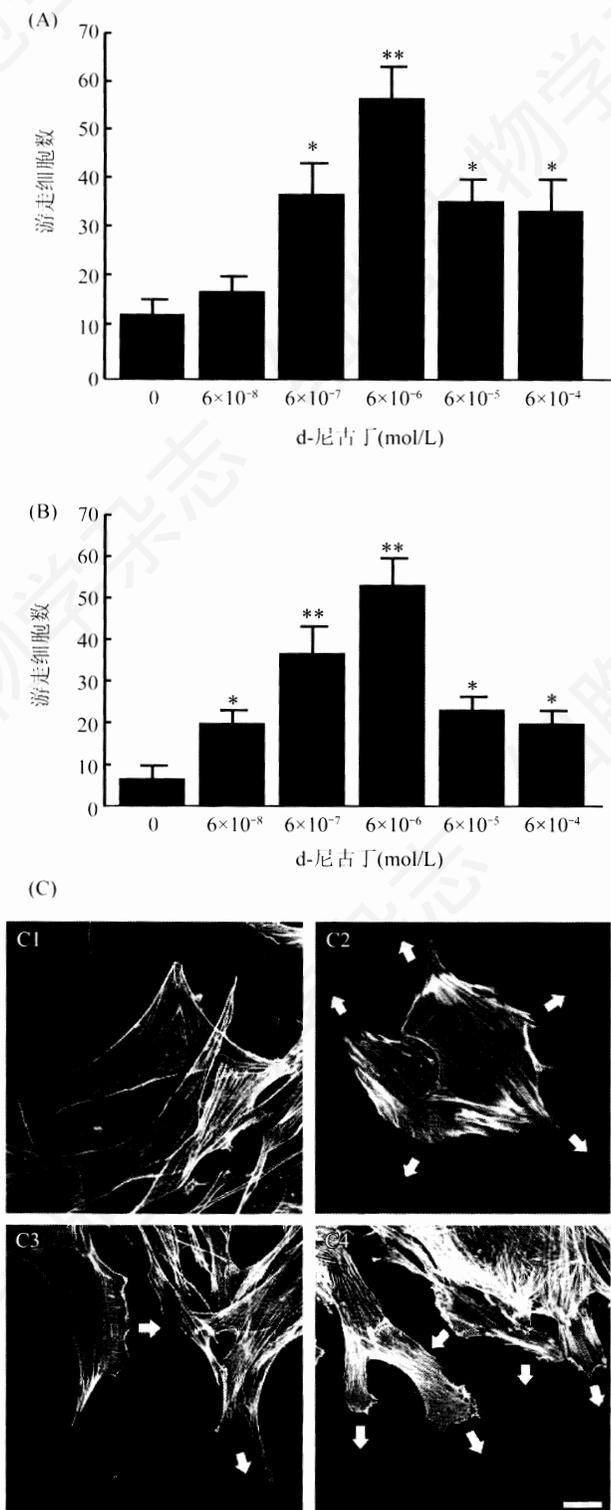


图1 尼古丁促进血管平滑肌细胞的迁移

A: 将不同浓度的d-尼古丁置于小室下层, 将未经处理的GbaSM-4细胞至于小室上层, 计数迁移到膜下层的细胞数目; B: 用不同浓度的d-尼古丁培养GbaSM-4细胞72 h后, 将细胞置于小室上层, 观察细胞迁移情况; C: 免疫荧光染色结果。c1, c2为 6×10^{-6} mol/L d-尼古丁处理, 并经划痕处理组; c3, c4为未经d-尼古丁处理组, 未经划痕处理组。箭头表示肌动蛋白分布趋向。与对照组相比, *t* 检验: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Bar=10 μ m。

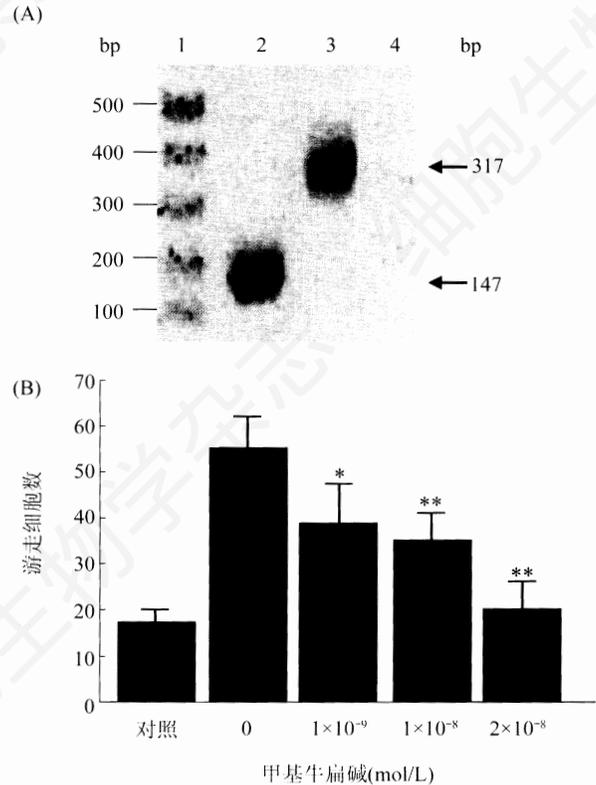


图2 烟碱乙酰胆碱受体与尼古丁促进血管平滑肌细胞迁移的关系

A: RT-PCR 检测血管平滑肌细胞 $\alpha 7$ 型烟碱乙酰胆碱受体表达。1: marker; 2: 阳性对照(产物为147 bp的DNA片断); 3: 实验组; 4: 阴性对照; B: 用不同浓度抑制剂甲基牛扁碱处理平滑肌细胞后, Boyden小室检测其对d-尼古丁诱导的促进细胞迁移作用的影响。与对照组相比, *t* 检验: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

显下降, Boyden小室实验发现d-尼古丁促进细胞迁移的能力明显受到抑制($P < 0.01$)。将21 bp双链RNA片断序列打乱后作为阴性对照转染细胞, 显示MLCK表达水平无变化, d-尼古丁的促细胞迁移能力也未受影响(图3A, 图3B)。预先用MLCK特异性的拮抗剂ML-9处理细胞后, 经Boyden小室检测, 结果显示ML-9可明显抑制d-尼古丁促进细胞迁移的作用($P < 0.01$)(图3C)。

3 讨论

动脉粥样硬化斑块的形成和发展与血管平滑肌细胞从血管中层向血管内膜迁移有关^[2]。吸烟与动脉粥样硬化的形成具有密切的关系, 作为烟草主要成分之一的尼古丁与动脉粥样硬化的发病是否直接有关, 以及其作用机制目前尚未见报道。有文献报道, 尼古丁可以刺激平滑肌细胞的增生, 并可促进自分泌生长调节因子的表达, 如促进血小板生长因

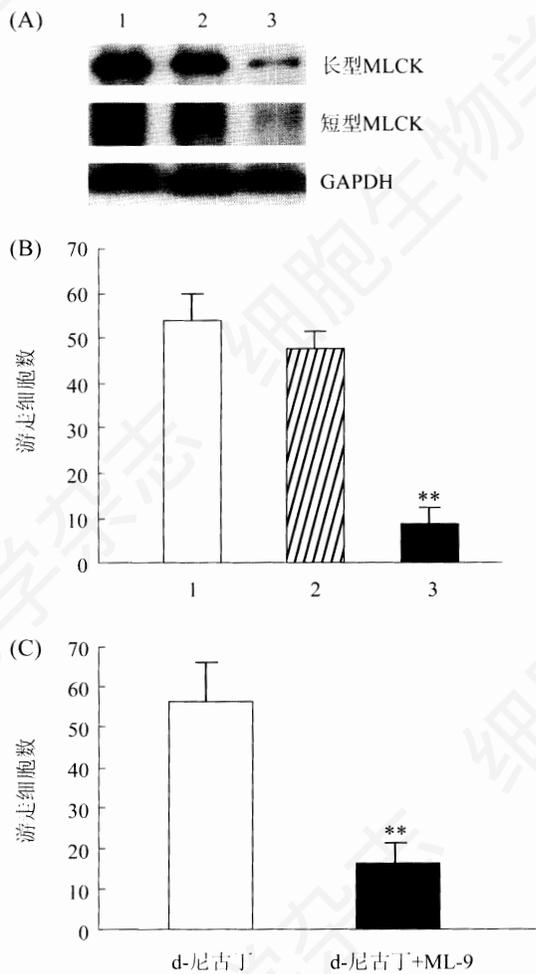


图3 肌球蛋白轻链激酶在尼古丁刺激细胞迁移中的作用

A: 用Western印迹检测当RNA干扰作用后血管平滑肌细胞MLCK蛋白表达水平的变化。1: 为未经任何处理的对照组; 2: 未经RNA干扰片段的对照组; 3: 进行RNA干扰的实验组。B: RNA干扰后检测d-尼古丁促细胞迁移能力。1: 为未经任何处理的对照组; 2: 未经RNA干扰片段的对照组; 3: 进行RNA干扰的实验组。C: 用MLCK拮抗剂ML-9预先处理血管平滑肌细胞, 观察d-尼古丁的促细胞迁移能力的变化。与对照组相比, t 检验: $**P < 0.01$ 。

子(PDGF)的分泌。PDGF是一个主要的促细胞分裂原, 是引起动脉粥样硬化的主要因素, 它的主要作用是促进平滑肌细胞由中层向内层的迁移。血管平滑肌细胞的迁移涉及促迁移信号的跨膜转导、细胞内信号分子的级联活化、细胞骨架蛋白的收缩和细胞的变形等过程^[7]。

为了探讨尼古丁对于平滑肌细胞迁移能力的影响, 本研究采用Boyden小室实验和免疫荧光染色, 检测了在d-尼古丁作用下平滑肌细胞的迁移能力和肌动蛋白分布与细胞形态的变化。研究结果显示, 生理范围浓度的尼古丁对GbaSM-4细胞的迁移能力

有不同程度的促进。结果显示, 6×10^{-6} mol/L浓度的d-尼古丁对细胞迁移能力的促进作用非常明显, 在平滑肌细胞中肌动蛋白的分布以及细胞形态等方面都呈现出明显的收缩状态。上述结果提示, d-尼古丁在平滑肌细胞的迁移中起到了趋化因子的作用, 使平滑肌细胞呈现为肌动蛋白的边缘分布以及细胞边缘膜褶凸起, 为细胞迁移状态的特征性表现。

尼古丁作用的受体是烟碱乙酰胆碱受体, 烟碱乙酰胆碱受体由9种不同的 α 亚基所组成^[8], 其中 $\alpha 7$ 亚基受体的生理学功能是当今研究的热点。为了阐明尼古丁促细胞迁移的作用与乙酰胆碱 $\alpha 7$ 亚基受体是否有关, 本研究对此进行了初步的探讨。应用RT-PCR方法结果显示, GbaSM-4细胞内存在烟碱乙酰胆碱 $\alpha 7$ 亚基受体mRNA的表达; 采用Boyden小室实验发现, d-尼古丁促GbaSM-4细胞的迁移能力随着烟碱乙酰胆碱 $\alpha 7$ 亚基受体特异性抑制剂甲基牛扁碱浓度的增加而逐渐减弱。上述结果提示, d-尼古丁对GbaSM-4细胞迁移的促进作用可能是通过细胞表面的乙酰胆碱 $\alpha 7$ 亚基受体而发挥作用的。在调节平滑肌细胞收缩中MLCK起了极为关键的作用^[9]。即当平滑肌细胞内的钙离子浓度增加时, Ca^{2+} 和钙调蛋白(CaM)结合, 引起CaM发生构象改变, 然后与MLCK相互作用, 从而激活肌球蛋白, 导致平滑肌收缩。我们运用MLCK的特异性拮抗剂ML-9和RNA干扰等方法, 探讨了在尼古丁促进平滑肌细胞迁移时MLCK是否参与这一过程。结果显示, 当MLCK的作用受到抑制后, d-尼古丁促进细胞迁移的作用也同样受到抑制。综上所述, 尼古丁以趋化因子的作用促进血管平滑肌细胞的迁移, 其分子机制可能与 $\alpha 7$ 型烟碱乙酰胆碱受体及MLCK等有关。因此, 吸烟与动脉粥样硬化的形成具有密切的关系。

参考文献 (References)

- [1] Conklin BS *et al.* *Am J Pathol*, 2002, **160**: 413
- [2] Cucina A *et al.* *Surgery*, 2000, **127**: 72
- [3] Bao J *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 9556
- [4] YE LH *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 6666
- [5] Tanaka H *et al.* *Cell Struct Funct*, 2001, **26**: 61
- [6] Alkondon M *et al.* *J Pharmacol Exp Ther*, 1993, **265**: 1455
- [7] Giancotti FG *et al.* *Science*, 1999, **285**: 1028
- [8] Lukas RJ *et al.* *Pharmacol Rev*, 1999, **51**: 397
- [9] Barany M. *Biochemistry of Smooth Muscle Contraction*, San Diego: Academic Press, 1996, 1

Effect of d-Nicotine on Migration of Vascular Smooth Muscle Cells

Li-Hong Ye*, Tie-Jun Zhao, Xiao-Dong Zhang*, Sheng Li¹
(College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract In order to demonstrate the relationship between smoking and arteriosclerosis the effect of d-nicotine on migration of vascular smooth muscle GbaSM-4 cells, a cell line of vascular smooth muscle cells (VSMCs) derived from guinea pig brain basilar arteries, was investigated. It was found that d-nicotine was able to promote the migration of the cells by Boyden's chamber assay. The expression and distribution of actin were increased in the body and lamellipodia of GbaSM-4 cells by immunofluorescent staining. The acetylcholine receptor ($\alpha 7$ -nAChR) was detectable in GbaSM-4 cells by RT-PCR. The effect of inducing migration was inhibited by an $\alpha 7$ -nAChR antagonist (methyllycaconitine) and an antagonist (ML-9) of myosin light chain kinase (MLCK) in the cells. And the effect of inducing migration was also depressed by down-regulating MLCK through RNA interference. The data demonstrated that the d-nicotine promotes the migration of vascular smooth muscle as chemotaxis, in which $\alpha 7$ -nAChR and MLCK are involved in the molecular mechanism. The finding provides experimental evidence for smoking resulting in arteriosclerosis.

Key words d-nicotine; vascular smooth muscle cells; migration; nicotinic acetylcholine receptor; myosin light chain kinase

Received: November 29, 2004 Accepted: April 7, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30170203)

¹Present address: Gunma University Graduate School of Medicine, Japan

*Corresponding author. Tel: 86-22-23506830, Fax: 86-22-23501385, E-mail: yelihong@nankai.edu.cn