

细胞代数和密度影响血管平滑肌细胞表型重塑和收缩反应性的机制

史建红 郑斌 韩梅 温进坤 *

(河北医科大学基础医学研究所, 河北省医学生物技术重点实验室, 石家庄 050017)

摘要 探讨细胞代数和密度对血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)表型重塑能力的影响及机制, 观察血清饥饿诱导的不同代数和密度的 VSMC 骨架的组构特征及收缩反应性, 检测细胞骨架中收缩蛋白的含量和比例变化。结果发现, 低代数(3 代)、高密度的 VSMC 经血清饥饿诱导后易于形成束状、极性排列的应力纤维, 乙酰胆碱(Ach)刺激可产生明显的收缩反应。Western 印迹显示, 3 代高密度 VSMC 中, 平滑肌 22 α (SM22 α)在 F- 肌动蛋白中的组成比例及其在 F-/G- 肌动蛋白的含量之比明显高于 8 代细胞。结果提示, SM22 α 在 F- 肌动蛋白中的分布比例可能决定了应力纤维的排布方式, 是细胞获得收缩性的主要调节因素, 在 VSMC 表型重塑过程中具有重要意义。

关键词 血管平滑肌细胞; 表型转化; 细胞骨架; 平滑肌 22 α

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)是一种非终末分化细胞, 可以收缩型(分化型)和合成型(去分化型)等表型形式存在。在特定条件下, VSMC 可在不同表型之间可逆转换, 该过程称为表型重塑^[1]。我室在研究血清刺激/饥饿诱导的 VSMC 表型重塑机制时发现, 随着细胞传代次数的增加及在不同细胞密度的条件下, 进行血清饥饿诱导后, VSMC 获得收缩反应性的能力存在明显差异^[2], 即细胞状态和培养条件可影响 VSMC 的表型重塑能力。那么, 造成不同代数和密度的 VSMC 表型重塑和收缩反应性不同的机制是什么? 为此, 本研究建立血清饥饿诱导 VSMC 细胞骨架重构模型, 研究不同代数和密度的 VSMC 细胞骨架丝状肌动蛋白(F- 肌动蛋白)微丝的组构特征及对乙酰胆碱(Ach)刺激后的收缩反应性, 观察不同状态下细胞骨架中收缩蛋白平滑肌(smooth muscle, SM) α - 肌动蛋白、平滑肌肌球重链蛋白(smooth heavy chain, SM-MHC)和平滑肌 22 α (SM22 α)的含量和比例变化, 及其与 F- 肌动蛋白组构方式和收缩性的相关关系, 为进一步研究 VSMC 表型重塑过程中调节细胞骨架组构和收缩功能的分子机制打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

SD 大鼠, 雄性(5 周龄, 0.1 kg), 由河北省实验动

物中心提供。DMEM 培养基购自 Gibco 公司; 小鼠抗 SM α - 肌动蛋白单克隆抗体购自 Sigma 公司; 小鼠抗 SM-MHC 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司; 兔抗 SM22 α 多克隆抗体为本研究室制备。

1.2 细胞培养与分组

取 5 周龄 SD 大鼠胸、腹主动脉, 用贴块法分离 VSMC, 在含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养液中培养, 取生长至 30%~50% 汇合(低密度)或超汇合(高密度)的 3 代和 8 代细胞进行实验。血清刺激培养的 VSMC 为合成型。按文献^[3]方法进行血清饥饿处理, 诱导 VSMC 分化, 并于血清饥饿 72 h 收集细胞。以细胞重新获得收缩性作为评价 VSMC 由合成型转化为收缩型的依据^[2]。

1.3 细胞骨架染色

将在玻片上培养的 VSMC 用冷 PBS 清洗两次, 4% 多聚甲醛预固定, 0.1% Triton X-100 室温处理 20 min, 1 μ mol/L TRITC 标记的鬼笔环肽染色, PBS 清洗, 甘油封片。于荧光显微镜下观察细胞骨架的变化。

1.4 细胞收缩性分析

收稿日期: 2006-08-21 接受日期: 2006-11-28

国家科技部重大基础研究前期研究专项项目计划(No.2005C CA03100), 国家自然科学基金(No.30570661)和河北省自然科学基金(No. C2006000814)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0311-86265563, E-mail: wjk@hebmu.edu.cn

按文献^[3]的方法进行, 3代或8代VSMC生长至30%~50%汇合或超汇合后, 分别于血清饥饿前、后向培养液中滴加Ach至终浓度为100 μmol/L, 于显微镜下观察, 测量1 min内细胞长度的变化(随机选择3个视野, 每个视野计数3次, 每次计数10个细胞), 以细胞长度缩短的幅度≥20%作为细胞收缩的标准。

1.5 蛋白质分步提取和Western印迹分析

取大约 4×10^6 个VSMC用50 μl细胞裂解液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1% Triton X-100, 5 mmol/L EGTA, 1 mmol/L Na₃VO₄, 1 mmol/L PMSF)在冰浴中裂解VSMC 30 min后, 4 °C, 12 000 r/min离心30 min, 收集上清液(含G-肌动蛋白, 肌动蛋白单体)。沉淀重悬于50 μl缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1 mmol/L 脱氧胆酸钠, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF)中冰浴30 min, 4 °C, 12 000 r/min离心30 min, 收集上清液(含F-肌动蛋白, 肌动蛋白纤维)^[4,5]。用改良酚法测定蛋白质含量后, 各组取等量G-肌动蛋白组分及相应等体积的F-肌动蛋白组分提取液经SDS-PAGE分离、转膜和脱脂奶粉封闭后, 分别与小鼠抗SM α-肌动蛋白单克隆抗体(1:400)、兔抗SM22α多克隆抗体(1:10)、小鼠抗SM-MHC单克隆抗体(1:400)及相应二抗进行反应, ECL发光试剂检测结果。

1.6 统计学分析

实验数据采用SPSS统计软件处理, 实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组之间进行多样本均数两两比较的单因素方差分析(one-way ANOVA), 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞代数和密度影响VSMC表型重塑能力

为了明确细胞代数和密度与血清饥饿诱导的VSMC表型重塑之间的相关关系, 分别选择低密度(30%~50%汇合)和高密度(超汇合)生长的3代和8代VSMC为研究对象, 进行血清饥饿处理72 h, 以Ach诱导的收缩作为细胞分化的标志。结果发现, 血清培养的合型VSMC对Ach刺激不产生收缩应答(结果未显示); 不同代数、不同生长密度的VSMC经血清饥饿处理后, Ach刺激均可诱导出现不同程度的细胞缩短(图1A)。对各组细胞长度缩短的幅度进行比较分析发现, 在Ach诱导下3代低密度和高密度的VSMC长度缩短的幅度分别为21%和40%, 而8代细胞分别为4%和22%。即3代细胞的缩短程度显著

高于相应的8代细胞。而相同代数的VSMC中, 超汇合的细胞收缩性又高于低密度培养的细胞(图1B)。结果提示, 血清饥饿诱导的VSMC表型重塑(再分化)的能力受细胞代数和密度的影响, 低代数(3代)、高密度(超汇合)的VSMC具有更强的表型重塑能力。

2.2 细胞代数和密度影响VSMC骨架的聚合

VSMC表型重塑是以细胞骨架重构为基础的。为了确定不同代数和密度的VSMC表型重塑能力存在差异的生物学机制, 应用鬼笔环肽进行特异性细胞骨架染色, 观察不同代数和密度VSMC细胞骨架微丝聚合的情况。结果显示, 血清培养的合型VSMC, 肌动蛋白纤维(F-肌动蛋白)呈稀疏网状、排列紊乱(图2A); 血清饥饿处理后, VSMC肌动蛋白纤维变得粗大。其中, 3代超汇合的VSMC细胞骨架肌动蛋白纤维形成束状、极性排列的应力纤维。3代低密度及8代超汇合的VSMC肌动蛋白纤维亦可形成应力纤维, 但大部分细胞的纤维束较前者略细且沿细胞周边排列, 呈几何状分布; 而8代低密度的VSMC则不能形成束状应力纤维(图2B)。结果提示, 不同代数和密度的VSMC其应力纤维的排布方式是不同的, 应力纤维排布的差异可能是导致细胞收缩性降低或消失的重要机制, 只有形成束状、极性排列的应力纤维的细胞才可获得收缩性。

2.3 细胞代数和密度影响收缩蛋白在细胞骨架中的分布

在细胞骨架F-肌动蛋白聚合形成应力纤维并获得收缩能力的过程中, 一些收缩装置蛋白直接或间接与肌动蛋白相结合而参与细胞骨架重构。为了进一步探明导致不同代数和密度的VSMC细胞骨架重构方式不同的分子机制, 本研究用蛋白质分步提取和Western印迹分别检测收缩蛋白SM α-肌动蛋白、SM22α和SM-MHC在F-/G-肌动蛋白组分中的分布及组成比例(图3A)。数据分析显示, 收缩性最强的3代高密度VSMC, 其F-肌动蛋白中的SM α-肌动蛋白:SM22α:SM-MHC比值约为1:0.6:1.5, SM22α和SM-MHC在F-肌动蛋白中的组成比例显著高于3代低密度和8代的细胞(图3B)。对三种收缩蛋白在F-/G-肌动蛋白组分的分布比例进行分析, 结果表明, 3代细胞中SM22α主要存在于F-肌动蛋白组分中, 其在F-/G-肌动蛋白的含量之比介于1.4~1.8, 明显高于8代细胞(均<1)。但是, 3代血清饥饿的细胞中, SM α-肌动蛋白聚合为F-肌动蛋白的比

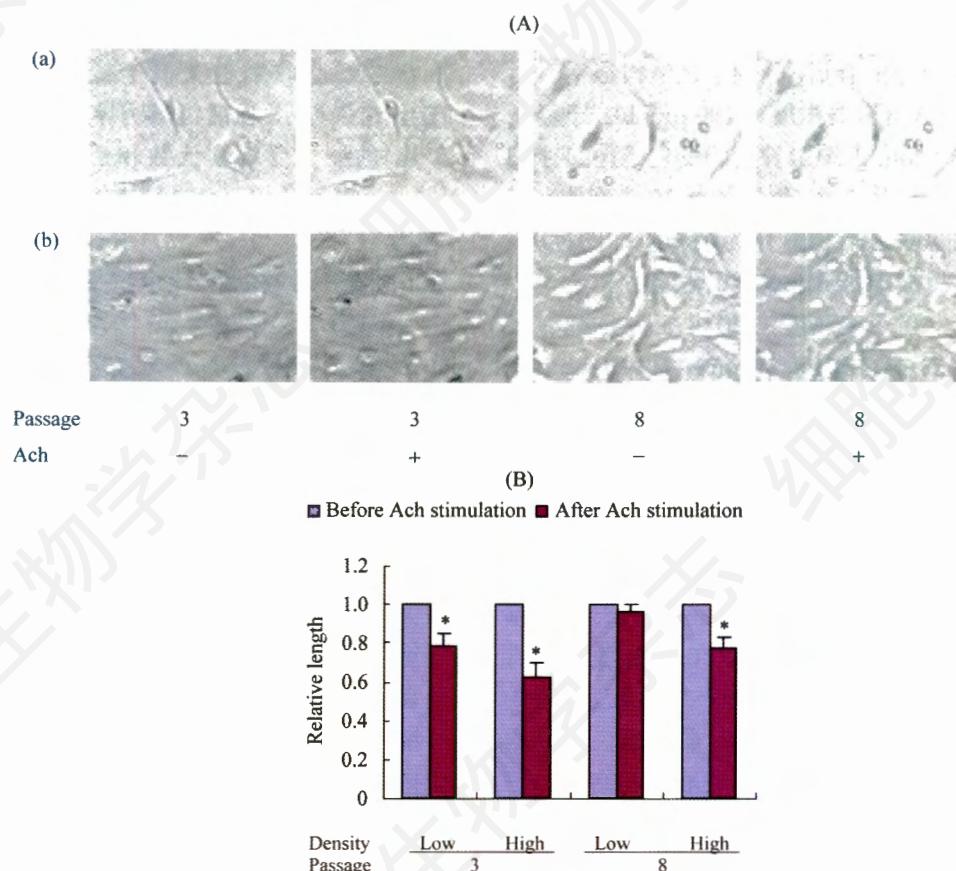


Fig.1 Effects of cell passage and density on contractile ability in VSMC

A: ACh induced contraction of VSMC in serum-free medium (10×20). a: Low density; b: High density. B: Relative length of VSMC after ACh stimulation. $*P<0.01$, compared with VSMC before stimulation.

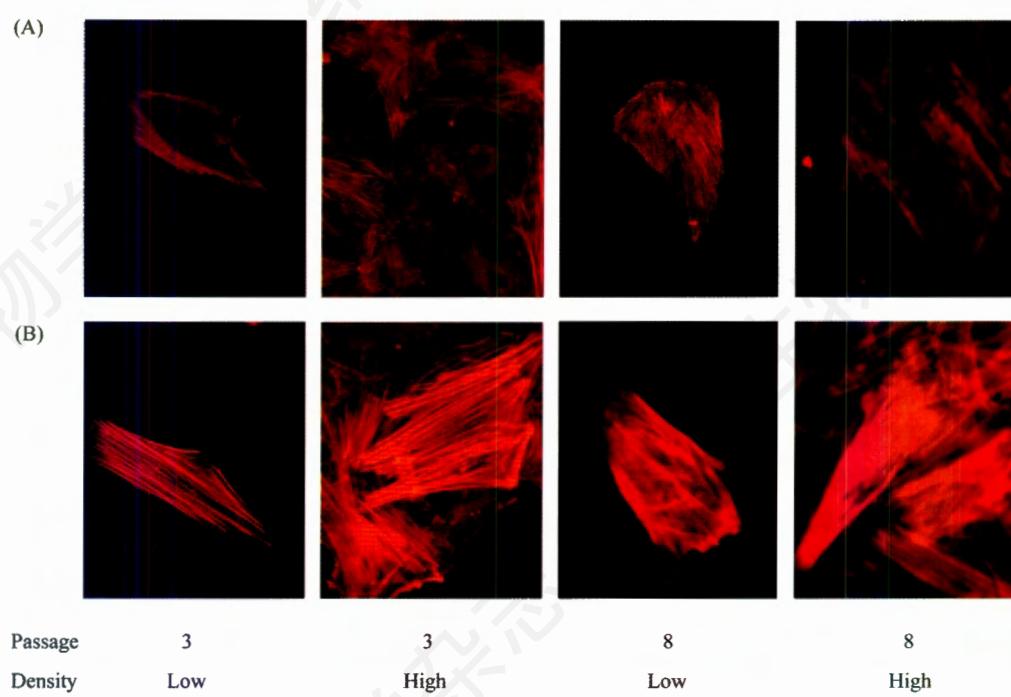


Fig.2 Effects of cell passage and density on cytoskeleton organization in VSMC (10×40)

A: VSMC in 10%FBS medium; B: VSMC in serum-free medium.

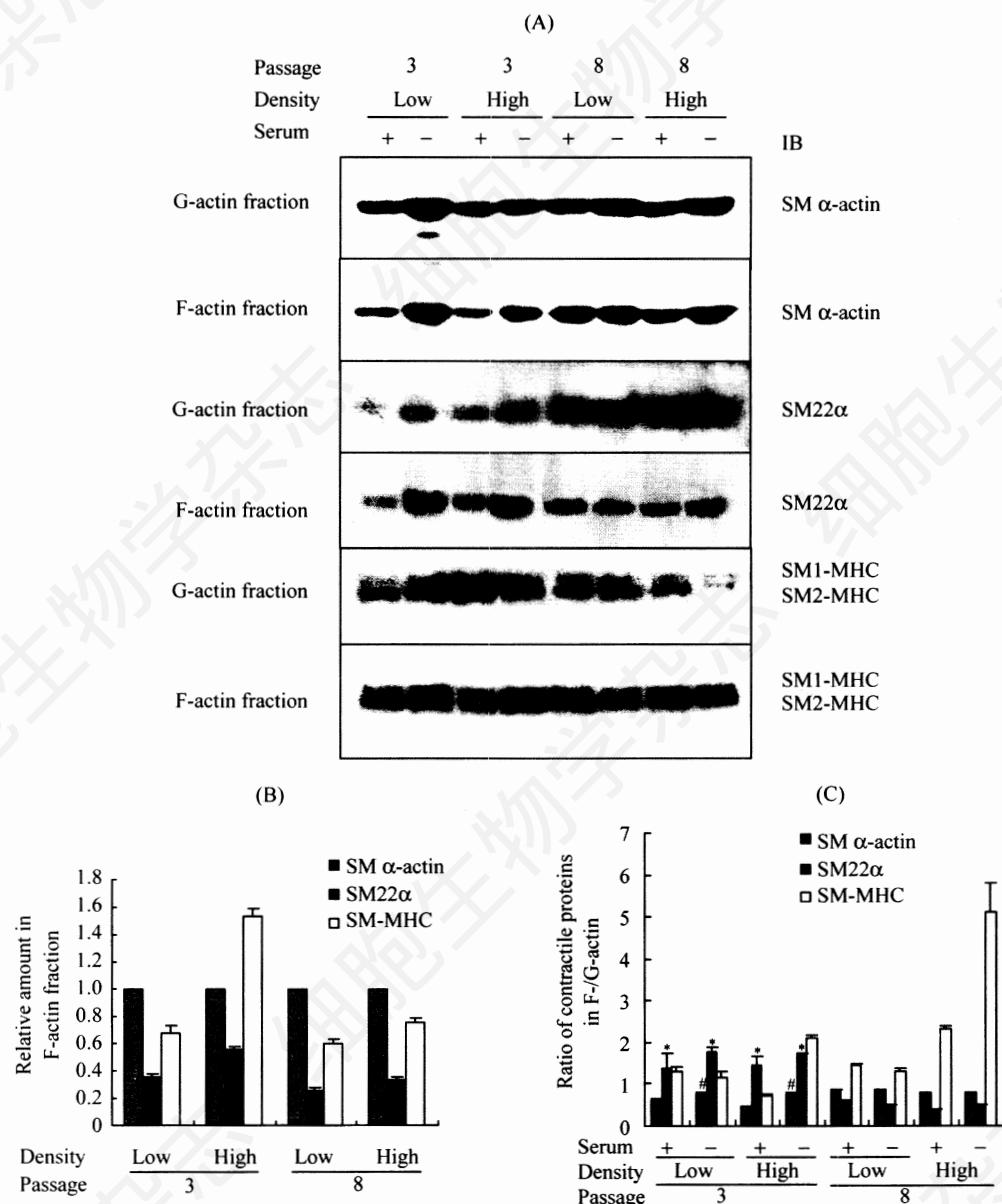


Fig.3 Effect of cell passage and density on expression of contractile apparatus proteins and distribution in F-/G-actin fraction in VSMC

A: Western blotting. B: Relative amount in F-actin fraction of VSMC in serum-free medium. C: Ratio of F-/G-actin fraction. * $P<0.01$, compared with passage 8; # $P<0.01$, compared with passage 3 in 10% FBS medium.

例略有增加, 而 8 代细胞中无明显变化(图 3C)。由此推测, SM22 α 在 F- 肌动蛋白中的分布比例可能决定了应力纤维的排布方式, 也可能是细胞获得收缩性的主要调节因素。

3 讨论

VSMC 作为血管壁中的主要细胞成分, 其表型重塑及伴随出现的生物学行为改变是血管重塑的重要病理学基础。近年发现, VSMC 表型重塑除了与其

基因表达谱型改变有关外, 还受细胞骨架结构与功能的影响, 许多表型标志蛋白都被证实参与 VSMC 骨架重构和收缩调节^[3,6]。因此, 研究 VSMC 表型调节的分子机制有助于揭示 VSMC 表型重塑和血管重塑事件的病理本质。

本实验室已成功建立了血清饥饿诱导 VSMC 再分化(即由合成型转化为收缩型)模型, 并对 VSMC 表型转化的分子机制进行了较深入的研究^[2]。但在研究中发现, 细胞的传代次数和密度可影响 VSMC 的表

型重塑能力和收缩反应性。一些研究也表明, 细胞传代次数的不同和密度差异可在一定程度上影响VSMC的生物学特性^[7~9]。为了进一步明确细胞代数、密度与VSMC的收缩反应性之间的关系及其内在机制, 分别将生长至不同密度(30%~50%汇合或超汇合)的3代和8代细胞进行血清饥饿, 以收缩反应性及细胞骨架微丝聚合为指标观察VSMC表型重塑能力。结果显示, VSMC的表型重塑受细胞代数和生长密度的影响, 低代数(3代)高密度培养的细胞具有更强的表型重塑能力。证实不同代数和密度的VSMC, 其应力纤维的重构与排布方式存在明显差异, 而且与细胞重新获得收缩性具有直接关系。低代数高密度的VSMC经血清饥饿诱导后易于形成束状、极性排列的应力纤维, Ach刺激可产生明显的收缩反应。进一步研究表明, 在不同代数和密度的VSMC中, 构成应力纤维的F-肌动蛋白组分中所含有的SM- α -肌动蛋白、SM22 α 和SM-MHC三种收缩蛋白的成份与比例是不同的, 尤以SM22 α 最为明显。低代数高密度培养的细胞无论有无血清刺激, SM22 α 均主要分布于F-肌动蛋白组分; 但是, 高代数(8代)细

胞中, SM22 α 则主要分布于G-肌动蛋白组分。由此提示, SM22 α 很可能是肌动蛋白骨架重构的一种关键调节因子, 是赋予VSMC收缩表型的重要功能蛋白, 该结果与长期以来将SM22 α 作为VSMC的特异性标志分子的观点是相一致的^[10]。

上述结果提示, VSMC的表型重塑能力随着传代次数的增加而逐渐降低, 趋于衰老的细胞其表型转化具有不可逆性。SM22 α 在VSMC表型重塑过程中具有重要作用, 可能是VSMC衰老的负调控因子, 其在F-肌动蛋白骨架重构中的作用机制有待于进一步探讨。

参考文献(References)

- [1] Yoshida T et al. *Circ Res*, 2005, **96**: 280
- [2] Han M et al. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, **291**: C50
- [3] Li S et al. *Circ Res*, 1999, **85**: 338
- [4] Tang DD et al. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 51722
- [5] 郑斌等. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, **21**: 255
- [6] 程云会等. 细胞生物学杂志, 2003, **25**: 384
- [7] Lin G et al. *J Cell Biochem*, 2004, **92**: 104
- [8] Bacakova L et al. *Histol Histopathol*, 2001, **16**: 675
- [9] Li Y et al. *Neuropeptides*, 1997, **31**: 503
- [10] Feil S et al. *Circ Res*, 2004, **94**: 863

Effects of Cell Passage Number and Density on Phenotypic Remodeling in Vascular Smooth Muscle Cells

Jian-Hong Shi, Bin Zheng, Mei Han, Jin-Kun Wen*

(Hebei Laboratory of Medical Biotechnology, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract To investigate the effects and mechanisms of cell passage number and density on phenotypic remodeling ability of vascular smooth muscle cells (VSMCs), cytoskeleton organization and contractile ability in VSMCs at different passage number and density were observed, and the changes of content and ratio of contractile proteins in cytoskeleton were detected. The results showed that low passage (passage 3) VSMCs at high density following serum deprivation were tending to form bundled and polar stress fibres, and their contractile ability induced by acetylcholine (Ach) was significantly higher than that in other groups. Western blot displayed that relative amount of smooth muscle 22 α (SM22 α) in F-actin fraction and its ratio in F-/G-actin fraction in passage 3 VSMCs at high density were remarkably higher than that in VSMCs at passage 8. In conclusion, distribution of SM22 α in F-actin fraction may determine the organization of stress fibres, which is a key factor for contraction ability of VSMCs. This protein may play an important role in VSMCs phenotypic remodeling.

Key words vascular smooth muscle cells; phenotypic remodeling; cytoskeleton; SM22 α

Received: August 21, 2006 Accepted: November 28, 2006

This work was supported by the Special Found for Preliminary Research of Key Basic Research Project of Ministry of Science and Technology of China (No.2005CCA03100), the National Natural Science Foundation of China (No.30570661) and the Natural Science Foundation of Hebei Province (No.C2006000814)

*Corresponding author. Tel: 86-311-86265563, E-mail: wjk@hebmu.edu.cn