DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.03.016

论著

文章编号:1000-5404(2000)03-0242-03

血管平滑肌细胞受低浓度一氧化碳作用后迁移的变化

王关嵩,钱桂生,杨晓静,李淑平,陈维中 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要 目的:探讨低浓度CO对大鼠主动脉平滑肌细胞迁移的影响。方法:体外培养大鼠主动脉平滑肌细胞,用低浓度CO处理24、48、72 h,检测平滑肌细胞迁移情况。结果:24、48、72 h后未加处理的对照组大鼠主动脉平滑肌细胞迁移距离逐渐增加,与24 h组比差异显著($P<0.001$)。20×10^{-6}、50×10^{-6}、80×10^{-6} CO处理细胞24 h后,细胞迁移距离逐渐下降,20×10^{-6} CO组与对照组差异不显著($P<0.05$),其余两组均显著低于对照组($P<0.01$)。20×10^{-6}、50×10^{-6}、80×10^{-6} CO处理细胞48、72 h后,其迁移距离也显著低于对照组($P<0.01$)。结论:大鼠主动脉平滑肌细胞自身存在迁移情况,培养时间愈长,迁移距离愈大。低浓度CO可以显著抑制平滑肌细胞的迁移,随着浓度增加,抑制作用增强。

关键词 CO;肺动脉;平滑肌细胞;迁移
中图法分类号 R322.74;R340.5 文献标识码 A

Migration of cultured vascular smooth muscle cells with the treatment of carbon monoxide of low concentration

WANG Guan-song, QIAN Gui-sheng, YANG Xiao-jing, LI Shu-ping, CHEN Wei-zhong (Department of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract **Objective**: To investigate the effects of exogenous carbon monoxide (CO) on the migration of cultured vascular smooth muscle cells (SMCs). **Methods**: Pulmonary artery SMCs were cultured and then treated with exogenous CO for 24, 28 and 72 h respectively. The migration distances of the SMCs were determined by Sarkar's method. **Results**: The migration distances of the SMCs treated for 24, 28 and 72 h were increased gradually (24 h group *vs* control: $P<0.001$). The migration distances of the SMCs were decreased after 24 h of the treatment with 20×10^{-6}, 50×10^{-6}, 80×10^{-6} CO (20×10^{-6} CO group *vs* control: $P<0.05$; 50×10^{-6}, 80×10^{-6} CO group *vs* control: $P<0.01$). After 72 h of the treatment, the distances were significantly lower than those in the control ($P<0.01$). **Conclusion**: SMCs may migrate under the condition of normal culture. The migration distance is increased with prolongation of culture. CO of low concentration can inhibit the migration of SMCs in a concentration-dependent manner.

Key words CO; pulmonary artery; smooth muscle cell; migration

在缺氧肺动脉高压和动脉粥硬化等多种病理条件下,动脉的内膜不同程度受损,受直接或间接因素的影响,中膜的血管平滑肌细胞(Vascular smooth muscle cell, VSMC)可以向内膜迁移大量增殖。我所近年来的研究表明,低浓度一氧化碳(Carbon monoxide, CO)处理后VSMC增殖可明显被抑制[1]。为了弄清低浓度CO对VSMC迁移的影响,通过设立羟基脲抑制增殖的阳性组,来探讨体外培养的VSMC受低浓度CO作用后迁移的状况。

1 材料与方法

1.1 大鼠主动脉平滑肌细胞的培养及低浓度CO处理

取5~6只大鼠,颈动脉放血处压,在无菌条件下,剥取大鼠主动脉,刮除内膜和外膜,复合酶法培养VSMC[2]。培养基内含10%胎牛血清的DMEM,传3代后用于实验。

利用本研究所建立的CO处理细胞小室来处理主动脉平滑肌细胞。即将传至3~6代的平滑肌细胞换1%胎牛血清培养24 h后放入小室,迅速抽气一充气,使小室内的气体换为20×10^{-6}、50×10^{-6}、80×10^{-6} CO+5%CO_2+N_2,然后关闭进气

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39700057)

作者简介:王关嵩(1967.10),男,河南省平顶山市人,博士研究生,讲师,主要从事慢性阻塞性肺疾病的机制及防治,血管舒张因子对血管壁细胞作用机制方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68755320

收稿日期:1999-09-29;修回日期:2000-01-03

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

口, 放入 37℃恒温箱孵育 24 h、48 h 和 72 h。

1.2 血管平滑肌细胞迁移距离的测定

参照 Sarkar 等[3] 建立的方法进行。将盖玻片置于 6 孔培养板中, 接种传代培养的 VSMC, 细胞长满后, 取出盖玻片, 在显微镜下用无菌刮刀将盖玻片上的 VSMC 沿对角线刮除一侧, 放回培养板中, 继续培养 24 h、48 h 和 72 h 作为对照组, 或用低浓度 CO 处理 VSMC, 或加入 5 nmol/L 羟基脲(Hydroxyurea)培养。在显微镜下观察细胞迁移情况, 以测定迁移最远的 VSMC 至刮线边缘的距离作为 VSMC 的迁移距离。每组观察 26 个盖玻片的细胞迁移距离, 取均值。结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用组间 t 检验。

1.3 主要试剂

DMEM、6 孔培养板(GibcoBRL、USA), 20×10^{-6}、50×10^{-6}、80×10^{-6} CO+5%CO_2+N_2 气(重庆仪表九厂), CO 监测报警仪(中国煤炭科学院重庆分院), 胎牛血清(Hyclone, USA), 羟基脲(Sigma, USA), 其它试剂均国产 AR 级。

2 结果

2.1 低浓度 CO 处理对平滑肌细胞迁移的影响

不同浓度 CO 处理平滑肌细胞 24、48、72 h 后, 其迁移距离见表 1。

表 1　不同时间 20×10^{-6}、50×10^{-6}、80×10^{-6} CO 处理后 VSMC 迁移距离(l/mm, $\bar{x} \pm s$, $n=16$)

Tab 1　Migration distances of VSMC treated by 20×10^{-6}, 50×10^{-6}, 80×10^{-6} CO respectively(l/mm, $\bar{x} \pm s$, $n=16$)

	Control group	20×10^{-6} CO	50×10^{-6} CO	80×10^{-6} CO	Hydroxyurea
24 h	3.72±0.50	3.41±0.55	2.98±0.42*	2.78±0.73**	3.48±0.36
48 h	4.73±0.59	4.09±0.65*	3.57±0.28#	2.93±0.61**	4.51±0.29
72 h	5.95±0.63	4.78±0.47**	3.99±0.56**	3.57±0.35**	5.91±0.64

*: $P<0.01$, **: $P<0.001$ *vs* control group

2.2 不同浓度 CO 培养不同时间内主动脉平滑肌细胞迁移的距离

从表 1 中可知, 未加实验因素时, 正常培养的对照组主动脉平滑肌细胞随着培养时间延长, 迁移的距离增加, 与 24 h 组比, 48 h 和 72 h 组迁移的距离显著增加($P<0.001$)。加入 CO 后 VSMC 迁移受到抑制, 且随着 CO 浓度的增加, 其对平滑肌细胞迁移的抑制作用增强, 呈依赖方式。24 h, 20×10^{-6} CO 组的迁移距离与对照组比差异不显著($P>0.05$), 24 h, 50×10^{-6} 组和 80×10^{-6} 组的迁移距离均低于对照组($P<0.05$, $P<0.01$), 48 h 和 72 h 各 CO 处理组的迁移距离均显著低于对照组(P 均<0.001)。

2.3 羟基脲对主动脉平滑肌细胞迁移的影响

作为细胞增殖抑制剂的羟基脲具有抑制细胞增殖作用, 可明显抑制细胞的生长。然而羟基脲的加入并未明显抑制 VSMC 迁移, 各时间内羟基脲组与对照组比差异不显著($P>0.05$), 说明 VSMC 的迁移并不是由其增殖造成。

3 讨论

CO 与一氧化氮(Nitric oxide, NO)类似, 属于血管舒张因子。我所在既往的研究中曾经应用同位素掺入和流式细胞仪等检测方法, 观察了低浓度 CO 对 VSMC 生长的影响。结果显示, 低浓度 CO 可以部分抑制 VSMC 的增殖[1]。本实验结果表明, 低浓度 CO 能显著抑制 VSMC 的迁移。此外, 我们还采用细胞增殖抑制剂羟基脲抑制细胞增殖, 检查细胞增殖对迁移的影响, 结果显示, 加入羟基脲后 VSMC 的迁移距离未受到明显抑制。说明, 低浓度 CO 抑制 VSMC 的迁移与其抑制 VSMC 的增殖作用无关。

低浓度 CO 抑制 VSMC 迁移可能和以下的机制有关。①调节血红素及 cGMP 水平。通过研究低氧对脐静脉内皮细胞的迁移与尿激酶型血浆酶原(uPAR)促进剂表达的关系发现, 低氧(1%O_2)时 uPAR 蛋白和 mRNA 表达均升高, 同时低氧也刺激血红素蛋白表达升高, 而在低氧气体中加入 CO 后, 可以阻止 uPAR 的表达。而用血管内皮生长因子(VEGF)处理内皮细胞, uPAR mRNA 水平未见升高。说明低氧时内皮细胞血浆酶原激活子活性的升高与强有力的迁移都是通过重构基膜完成的, 不是通过 VEGF 依赖的机制, 而是通过血红素依赖的通道[4]。此外, CO 可以和钙调蛋白组成复合物, 进而调节血红素—CO 系统, 调整钙调素的亲合力和代谢, 影响 cGMP 等第二信使系统[5]。②抑制胞外基质和一些蛋白基因的表达。有研究表明 VSMC 的迁移与细胞外基质如 IV 型胶原降解及细胞收缩蛋白基因过度表达有关[6]。Fukui 等[7] 将 p21 基因转染至兔主动脉 VSMC 后发现形态改变, 细胞骨架蛋白的伸展受抑制, 进而使 VSMC 的迁移受阻。我们的试验发现 CO 作用后 α-actin 的表达减弱, Vinculin 等细胞骨架蛋白的表达受抑制。此外 CO 作用可以使肌球蛋白发生突变。但是也有研究证实高浓度 CO(10 mmol/L)可以促进人中性粒细胞的迁移, CO 可以促进 cGMP 短暂而迅速的升高。提示 CO 的促进作用与介导 cGMP 和 G 激酶有关[8]。说明 CO 的作用和浓度有关。

既往有文献研究去除培养基中的 NO 后, 其对

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

SMC 增生的抑制作用是可逆的, SMC 胶原和蛋白合成所受的抑制作用也是可逆的。证明, 外源性 NO 对 SMC 的抑制作用并非简单的细胞毒作用。去除外源性NO 供体后, 虽然可使细胞迁移的距离延长, 但迁移的细胞数并无明显增加[9]。至于去除外源性 CO 后, SMC 的迁移距离如何改变, 细胞毒作用如何, 均尚待进一步研究。

参考文献

[1] 王关嵩, 钱桂生, 杨晓静, 等. 一氧化碳对大鼠血管平滑肌细胞低氧性增殖反应的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(2): 115—117.

[2] 王关嵩, 钱桂生, 杨晓静, 等. 2 种酶消化法培养大鼠血管平滑肌细胞生长特性的比较[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(10): 765—768.

[3] Sarkar R, Meinberg E G, stanley J C, *et al*. Nitric Oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells[J]. Circ Res, 1996, 78(2): 225—230.

[4] Graham C H, Fitzpatrick T E, McCrae K R. Hypoxia stimulates urokinase receptor expression through a heme proteindependent pathway[J]. Blood, 1998, 91(9): 3 300—3 307.

[5] Leclerc L' Hostis E, Franzen S, Lambry J C, *et al*. Picosecond geminate recombination of CO to the complexes calmodulin heme-CO and calmodulin heme-CO melittin[J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1 293(1): 140—146.

[6] Pauly R R, Passaniti A, Bilato C, *et al*. Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation[J]. Circ Res, 1994, 75(3): 417—420.

[7] Fukui R, Schibata N, Kohbayashi E, *et al*. Inhibition of smooth muscle cell migration by the p21 cyclin-dependent kinase inhibitor[J]. Arterosclerosis, 1997, 132(1): 53—57.

[8] Van Uffelen B E, De koster B M, Vanstevenincle J, *et al*. Carbon monoxide enhances human neutrophil migration in a cyclic GMP-dependent way[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 226(1): 21—26.

[9] Kolpakov V. Gordoh D, Kulik T J. Nitric oxid-generating compounds inhibit total protein and collegen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells[J]. Circ Res, 1995, 76(1): 305—309.

(编辑 薛国文)

经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2000)03-0244-01

炎性口腔粘膜中 VEGF 和 bFGF 的表达

Expression of VEGF and bFGF in inflammatory oral mucosa

张从纪[1], 李慧增[1], 周树夏[2], 杨 军[1] ([1] 第三军医大学附属西南医院口腔科, 重庆 400038; [2] 第四军医大学口腔医学院, 西安 730031)

血管再生是创伤愈合过程中重要的一环, 血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(Basic fibroblast growth factor, bFGF)在此过程中具有广泛的调节作用[1,2]。然而, 它们在口腔粘膜软组织中的分布和作用目前尚不清楚。为此, 我们观察了 bFGF 和 VEGF 在口腔粘膜软组织正常和炎症修复中的表达。

1 材料与方法

1.1 标本

选用患者口腔粘膜软组织标本(排除肿瘤组织), 分为正常组和慢性炎症组, 分别为 12 例和 18 例。常规固定、包埋、切片。

1.2 VEGF 的免疫组化染色

采用 ABC 免疫组化试剂盒(Vector 公司产品)染色, 按说明书进行操作, 其中一抗为抗人 VEGF 多抗(兔)(Santa Cruz Biotechnology 产品)。

1.3 bFGF 原位杂交检测

bFGF 为人源性寡聚核苷酸探针(Oncogene Science 公司), 探针的标记按照 DIG-Oligo-3′末端标记试剂盒进行(Boehringer Mannheim Biochemical)。实验阴性对照为除去探针的空白对照及 RNase 消化对照。

1.4 图像分析及统计学处理

采用 TIGER 920G 细胞图像分析仪检测其光密度值(D值), 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学处理应用 SPSS for Windows 软件包进行方差分析检验。

(下转 248 页)

作者简介: 张从纪(1968. 2), 男, 河北省永年县人, 硕士, 住院医师, 主要从事颌面部创伤及修复方面的研究, 发表论文 7 篇。电话: (023)68754135

收稿日期: 1999-10-06; 修回日期: 1999-12-22

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net