

# 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

石 缨

温进坤

(河北医科大学基础医学研究所生物化学研究室, 石家庄 050017)

主题词 肌, 平滑, 血管; 骨桥蛋白; 基因表达; 肌酸激酶; 成纤维细胞生长因子, 碱性; 肝素; 血清白蛋白, 牛

摘 要 为探讨新生小牛血清和碱性成纤维细胞生长因子促血管平滑肌细胞迁移与肝素抑制新生小牛血清促血管平滑肌细胞迁移的分子机制, 采用反转录聚合酶链反应方法合成骨桥蛋白 cDNA 探针, 以羟基脲抑制新生小牛血清、碱性成纤维细胞生长因子对血管平滑肌细胞的促增殖作用后, 观察其对骨桥蛋白基因表达及能量转换的影响。结果发现, 新生小牛血清、碱性成纤维细胞生长因子均能显著诱导血管平滑肌细胞骨桥蛋白基因表达, 在两种因素作用下肌酸激酶活性分别较对照组升高 76% 和 61%, 具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ); 在肝素与新生小牛血清共同作用下, 骨桥蛋白基因表达减弱, 细胞肌酸激酶活性也较新生小牛血清单独作用时降低 22%。提示新生小牛血清和碱性成纤维细胞生长因子促进血管平滑肌细胞迁移以及肝素抑制新生小牛血清促血管平滑肌细胞迁移的作用与细胞内骨桥蛋白基因表达改变和能量转换有关。

## Effects of Basic Fibroblast Growth Factor, Newborn Calf Serum and Heparin on Osteopontin Gene Expression of Rat Vascular Smooth Muscle Cells

SHI Ying and WEN Jin-Kun

(Department of Biochemistry, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**MeSH** Muscle, Smooth, Vascular; Osteopontin; Gene Expression; Creatine Kinase; Fibroblast Growth Factor, Basic; Heparin; Serum Albumin, Bovine; Rats

**ABSTRACT** **Aim** To explore the molecular mechanisms of cultured rat vascular smooth muscle cell (VSMC) migration stimulated by newborn calf serum (NCS) or basic fibroblast growth factor (bFGF) and the mechanism of heparin inhibition on VSMC migration induced by NCS. **Methods** Rat osteopontin cDNA probe was amplified by RT-PCR. After hydroxyurea inhibited VSMC proliferation induced by bFGF and NCS, osteopontin gene expression and cell energy exchange were respectively analyzed by Northern blotting and creatine kinase-NAC kit. **Results** Northern blotting results showed that bFGF and NCS could induce VSMC osteopontin gene expression. However, heparin could inhibit osteopontin gene expression induced by NCS. Creatine kinase activity in VSMC stimulated by bFGF and NCS increased by 76% and 61%, respectively, as compared with that of the control ( $P < 0.05$ ), and creatine kinase activity of the NCS+heparin group was 22% lower than that of the NCS group. **Conclusion** VSMC migration stimulated by NCS or bFGF and heparin inhibition on VSMC migration induced by NCS were related with osteopontin gene expression and increased energy exchange.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的增殖和迁移在动脉粥样硬化斑块形成及血管成形术后再狭窄的发生过程中起着重要作用。正常情况下, 动脉壁中层的 VSMC 处于分化状态, 呈收缩表型, 没有增殖和迁移能力, 但在多种刺激因素作用下, 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<sup>[1]</sup>。已证明两种表型的 VSMC 在基因表达上存在明显差异, Shanahan 等<sup>[2]</sup>用差

异 cDNA 显示技术在呈增殖状态的传代 VSMC 中分离到两种显著表达的 cDNA, 分别为骨桥蛋白 (osteopontin) cDNA 和基质 Gla 蛋白 cDNA, 两者在呈分化状态的 VSMC 中几乎不进行表达, 因此, 他们将其视为 VSMC 表型转化的基因标志。但骨桥蛋白和基质 Gla 蛋白表达是否与 VSMC 迁移有关系, 目前未见报道。本文在以往研究工作<sup>[3]</sup>的基础上, 用羟基脲抑制 VSMC 增殖后, 观察新生小牛血清 (newborn calf serum, NCS)、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 促进 VSMC 迁移与诱导骨桥蛋白基因表达之间的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

SD 大鼠由河北省实验动物中心提供; M199 培养基为 GIBCO 公司产品; bFGF 购自北京邦定生物医学公司; 肝素注射液为上海生物化学制药厂产品; NCS 为本室自制; EcoRI、Taq DNA 聚合酶、dNTP、AMV 反转录酶及随机引物试剂盒为 Promega 公司产品; 引物由上海生物医学工程中心合成; 肌酸激酶试剂盒为上海长征医学科学有限公司产品。

### 1.2 大鼠血管平滑肌细胞的培养

选用 8~10 周龄雄性 SD 大鼠, 取胸主动脉, 应用贴块法<sup>[4]</sup>, 于 37℃, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱内, 用含 10% NCS 的 M199 培养液(含青霉素 10<sup>5</sup> u/L, 链霉素 100 mg/L)进行原代培养, 待 VSMC 爬满培养瓶后, 胰蛋白酶消化传代, 取 5~10 代细胞进行实验。

### 1.3 骨桥蛋白 cDNA 聚合酶链反应引物设计

根据 Oldberg 等<sup>[5]</sup>报道的骨桥蛋白 cDNA 序列设计聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)上、下游引物分别为: 5'-GCAT-TACAGCAAACACTC3' 和 5'-CCAAGCTAT-CACCTCGGC-3'。扩增产物为骨桥蛋白 cDNA 172~524 bp 之间的序列, 长度为 353 bp, 在 253 bp 处有一个 EcoRI 酶切位点。

### 1.4 反转录-聚合酶链反应

采用异硫氰酸胍一步法从大鼠 VSMC 中提取总 RNA<sup>[6]</sup>。取总 RNA 1 μg, 2 mmol/L dNTP 8 μL, 5×AMV 反转录酶 buffer 4 μL, AMV 反转录酶 1 μL, 下游引物 1 μL (50 pmol), 灭菌三蒸水 5 μL; 42℃ 保温 30 min 进行反转录反应。取反转录产物 4 μL 作为模板, 按 Sambrook 等<sup>[7]</sup>方法进行 PCR 反应, 循环数 30。

### 1.5 反转录-聚合酶链反应产物回收及鉴定

用低熔点琼脂糖回收扩增产物。回收片段经 EcoRI 酶切后, 用 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定。

### 1.6 Northern blot 分析

接近铺满 80% 瓶底的传代 VSMC 以无血清 M199 培养液+5 mmol/L 羟基脲饥饿培养 24 h 后, 分别换成含 20% NCS+5 mmol/L 羟基脲、40 μg/L bFGF+5 mmol/L 羟基脲和 20% NCS+5.0 ×10<sup>5</sup> u/L 肝素+5 mmol/L 羟基脲的 M199 培养液(分别称为 NCS 组、bFGF 组和肝素组), 以无血清 M199 培养液+5 mmol/L 羟基脲培养的 VSMC 作为对照组。在上述条件下培养 24 h 后, 提取总 RNA。取 RNA 30 μg, 经 1% 琼脂糖-甲醛变性凝胶电泳后, 转移至尼龙膜上。骨桥蛋白 cDNA 片段

用随机引物法标记, 按文献<sup>[7]</sup>方法与尼龙膜杂交。

### 1.7 血管平滑肌细胞中肌酸激酶活性的测定

血管平滑肌细胞(VSMC)在上述 4 种条件下培养 24 h 后, 用 Policeman 回收细胞, 在冰水浴中将细胞匀浆后, 4℃ 5 000 r/min 离心 5 min, 取上清液用全自动生物化学分析仪测定肌酸激酶活性。

### 1.8 统计学处理

全部实验数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 差异的显著性采用组间 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 骨桥蛋白 cDNA 探针的制备

由图 1A (Figure 1A) 可见, 大鼠 VSMC RNA 经反转录-聚合酶链反应和聚丙烯酰胺凝胶电泳, 被扩增样品中出现一条约 353 bp 的条带, 其长度与预期结果相符; 扩增产物经 EcoRI 酶切后得到两条长度分别为 270 bp 和 83 bp 的片段(图 1B, Figure 1B), 酶切位点位置与文献<sup>[5]</sup>报道一致, 提示该扩增产物为骨桥蛋白 cDNA。

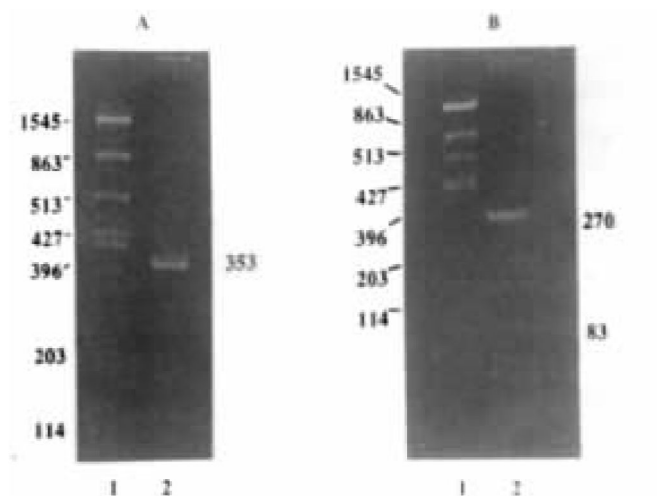


图 1. 大鼠骨桥蛋白 mRNA 的反转录-聚合酶链反应扩增产物及 EcoRI 酶切图谱

**Figure 1. RT-PCR products of rat osteopontin mRNA (A) and its restriction analysis by EcoRI (B).** Fig A. Lane 1: Marker; Lane 2: RT-PCR product. Fig B. Lane 1: Marker; Lane 2: RT-PCR products digested by EcoRI

### 2.2 新生小牛血清、碱性成纤维细胞生长因子和肝素对血管平滑肌细胞骨桥蛋白基因表达的影响

如图 2 (Figure 2) 所示, 从对照组细胞和正常大鼠主动脉壁提取的 RNA 与骨桥蛋白探针杂交后不出现明显的杂交信号; NCS、bFGF 作用于 VSMC 24 h 后, 骨桥蛋白基因表达活性显著增强, NCS>bFGF。此结果说明, NCS 和 bFGF 均能显著诱导体外培养的 VSMC 表达骨桥蛋白, 但 NCS 作

用较强;NCS+肝素的信号强度明显弱于 NCS,提示肝素具有抑制 NCS 促骨桥蛋白基因表达的作用;正常大鼠主动脉壁及处于静止期的传代 VSMC 不表达骨桥蛋白或表达量很低。

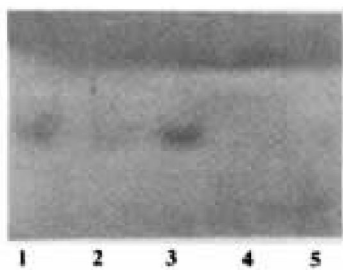


图 2. 大鼠血管平滑肌细胞骨桥蛋白 mRNA 的 Northern 印迹分析

**Figure 2. Northern blot analysis of rat VSMC osteopontin mRNA.** 1: NCS; 2: NCS+heparin; 3: bFGF; 4: control; 5: aorta

### 2.3 新生小牛血清、碱性成纤维细胞生长因子和肝素对血管平滑肌细胞肌酸激酶活性的影响

从表 1 (Table 1) 可见, NCS 组和 bFGF 组 VSMC 肌酸激酶活性分别较对照组升高 76% 和 61%, 具有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。NCS 组细胞培养液中加入肝素(肝素组)后, 其肌酸激酶活性比 NCS 组降低 22%, 表明肝素具有拮抗 NCS 促 VSMC 能量转换的作用。

表 1. 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肌酸激酶活性的影响

**Table 1. Influence of NCS, bFGF and heparin upon VSMC creatine kinase activity ( $\mu$ ,  $\bar{x} \pm s$ )**

Groups	n	Creatine kinase activity
Control	8	1426.8 $\pm$ 299.2
20% NCS	8	2505.7 $\pm$ 345.6 <sup>a</sup>
40 $\mu$ g/L bFGF	6	2299.9 $\pm$ 280.7 <sup>a</sup>
20% NCS+5.0 $\times 10^5$ u/L heparin	6	1956.3 $\pm$ 252.0

a:  $P < 0.05$ , compared with control group

### 3 讨论

骨桥蛋白最早是作为一种基质蛋白发现于骨骼中, 随后在肾脏、内耳、大脑、胎盘、骨髓、肿瘤细胞以及表皮细胞也都发现有骨桥蛋白存在<sup>[8]</sup>。1986 年 Oldberg 等<sup>[5]</sup>首先将其命名为骨桥蛋白, 并且发现骨桥蛋白氨基酸序列中有一个 RGD (Arg-Gly-Asp) 细胞粘附基元。许多细胞基质粘附蛋白如纤维连结蛋白 (fibronectin)、玻连蛋白 (vitronectin)、层粘连蛋白 (laminin) 等都有类似结构, 这些粘附蛋白

与细胞的粘附和迁移功能密切相关。

我室以往的研究发现, NCS 和 bFGF 能显著刺激体外培养的 VSMC 增殖和迁移<sup>[3]</sup>, 并证实骨桥蛋白在处于增殖状态的 VSMC 中有高表达<sup>[1]</sup>。在此基础上, 本文用羟基脲抑制 NCS 和 bFGF 所引起的 VSMC 增殖后, 观察其促进 VSMC 迁移与诱导骨桥蛋白基因表达之间的关系。结果发现, 在 NCS 和 bFGF 促 VSMC 增殖和迁移作用最强的浓度点, 两者均能明显诱导骨桥蛋白基因表达。前文我们报告肝素具有抑制 NCS 促 VSMC 迁移的作用<sup>[3]</sup>, 本文证实该物质还能抑制 NCS 诱导的骨桥蛋白基因表达。由此说明, NCS 和 bFGF 促 VSMC 迁移的作用与其诱导骨桥蛋白基因表达有关, 提示骨桥蛋白基因可能是 VSMC 迁移相关基因。肌酸激酶是细胞内与能量转换有关的酶类, VSMC 的迁移是消耗能量的过程。我们发现, 在 NCS 和 bFGF 作用下, VSMC 肌酸激酶活性较对照组显著升高, 肝素组活性比 NCS 组有所下降, 证明肌酸激酶活性与 VSMC 迁移及骨桥蛋白基因表达是相关的。本文为进一步深入研究 VSMC 迁移的分子机制奠定了实验基础。

### 参考文献

- 1 温进坤, 石 纛. 血管平滑肌细胞增殖调控机理的研究进展. 生理科学进展, 1996, **27**(2): 149-152
- 2 Shanahan CM, Weissberg PL, Metcalfe JC. Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1993, **73**(2): 193-204
- 3 石 纛, 温进坤. 碱性成纤维细胞生长因子、新生小牛血清和肝素对大鼠血管平滑肌细胞迁移的影响. 中国动脉硬化杂志, 1998, **6**(3): 189-192
- 4 Hirata Y, Takagi Y, Takata S, et al. Calcitonin gene-related peptide receptor in cultured vascular smooth muscle and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, **151**(3): 1113-1117
- 5 Oldberg A, Franzen A, Heinegard D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**: 8819-8823
- 6 Chinczyski P, Sacchi N. Single-step methods of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**(1): 156-159
- 7 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989;
- 8 Butler WT. The nature and significance of osteopontin. *Connect Tissue Res*, 1989, **23**(2): 123-136

(此文 1998-09-21 收到, 1999-02-01 修回)

(此文编辑 胡必利)