

## • 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2002)10-04-0294-03

## 香烟尘粒对血管平滑肌细胞增殖的作用

张 晓, 胡晓兰, 徐仓宝, 张亚萍

(西安交通大学医学院病理生理学教研室, 陕西省西安市 710061)

[主题词] 香烟; 肌, 平滑, 血管; 细胞增殖; 内皮素; 动脉粥样硬化

[摘 要] 为探讨香烟尘粒对血管平滑肌细胞是否有促增殖作用及其作用机制, 以兔主动脉平滑肌细胞为实验对象, 选用细胞存活率 > 90% 的小剂量(1: 1000、2: 1000 和 3: 1000)香烟尘粒, 分别加入培养基中, 采用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法、流式细胞仪分析、细胞蛋白测定和放射免疫法观察香烟尘粒对血管平滑肌细胞增殖及内皮素 1 分泌的影响。结果发现, 与对照组(不加香烟尘粒组)相比, 1: 1000、2: 1000 和 3: 1000 香烟尘粒组细胞蛋白吸光度值无明显差异( $P > 0.05$ ); 1: 1000 和 2: 1000 香烟尘粒组血管平滑肌细胞增殖明显( $P < 0.01$ ); 流式细胞仪分析结果显示, 2: 1000 香烟尘粒组  $G_1$  期细胞数明显减少( $P < 0.05$ ), S 期细胞数显著增多( $P < 0.01$ )。1: 1000、2: 1000 和 3: 1000 香烟尘粒组培养基中内皮素 1 含量均显著增高, 尤以 2: 1000 组增高最明显( $P < 0.01$ )。结果表明, 1: 1000 和 2: 1000 香烟尘粒有促进血管平滑肌细胞增殖的作用, 其促增殖作用可能与内皮素 1 合成释放增多有关。

[中图分类号] R364.3

[文献标识码] A

## Effects of Dimethylsulfoxide (DMSO)-Soluble Particles from Cigarette Smoke on the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cell

ZHANG Xiao, HU Xiao-Lan, XU Cang-Bao, and ZHANG Ya-Ping

(Department of Pathophysiology, Medical College of Xi'an Jiao Tong University, Xi'an 710061, China)

[MeSH] Cigarette Smoke; Muscle, Smooth, Vascular; Cell Proliferation; Endothelin; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To ascertain whether Dimethylsulfoxide (DMSO)-soluble particles from cigarette smoke (DSP) stimulate the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** Rabbit aortic vascular smooth muscle cells were used as target cell. The proliferation of VSMC was assayed by the measurement of MTT and flow cytometry. Cellular protein assay (ELISA) was used to observe the change of protein content. The amount of endothelin 1 (ET-1) secreted by VSMC was measured by radioimmunoassay (RIA). **Results** In contrast to the control group (without DSP), protein absorbance of VSMC added 1: 1000, 2: 1000 and 3: 1000 DSP did not make significant difference ( $P > 0.05$ ). VSMC added 1: 1000 and 2: 1000 DSP showed proliferation significantly ( $P < 0.01$ ), and yet 3: 1000 DSP group did not. The amount of ET-1 in the medium of DSP groups were significantly increased, especially in 2: 1000 DSP group ( $P < 0.01$ ) and the result of flow cytometry showed that in 2: 1000 DSP group, the cell numbers of  $G_1$  phase were decreased and cell numbers of S phase were increased markedly ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** 1: 1000 and 2: 1000 DSP can stimulate significantly the proliferation of VSMC, and ET-1 produced by VSMC may play an important role in the proliferation of VSMC.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种以细胞增殖为主的病理过程。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖是动脉粥样硬化发展过程中的关键变化<sup>[1]</sup>。吸烟作为动脉粥样硬化的独立危险因素,其致病机理仍未阐明。DSP(dimethylsulfoxide-soluble particles)为二甲基亚砷溶解的香烟

尘粒,Shu 等<sup>[2]</sup>研究初步表明,DSP 通过呼吸道或肠道进入血液后,溶解在低密度脂蛋白中,低密度脂蛋白作为一种载体,将香烟尘粒运送到血管壁,可能参与了动脉粥样硬化斑块的发生和发展。DSP 影响血管细胞的分子病理机制尚未阐明,本课题通过离体实验,将 DSP 作用于培养的血管平滑肌细胞,拟从细胞水平探讨其对血管平滑肌细胞的影响及其可能机制。

[收稿日期] 2001-12-03 [修回日期] 2002-06-24

[基金项目] 陕西省自然科学基金(97SM48)资助。

[作者简介] 张晓,男,1970 年 7 月出生,湖南长沙人,讲师,硕士研究生,研究方向为动脉粥样硬化的分子病理机制及防治。现在西南师范大学现代分析科学研究所工作。胡晓兰,女,1970 年 7 月出生,四川宜宾人,硕士研究生,研究方向为动脉粥样硬化的分子病理机制及防治。徐仓宝,1957 年 3 月出生,陕西岐山人,研究员,博士研究生导师,西安交通大学医学院动脉粥样硬化研究室暨分子生物学技术培训中心主任,主要从事血管细胞生物学及动脉粥样硬化发病机制的研究工作,发表有关研究论文 50 多篇,获国家、省(部)级科学基金资助课题 10 余项。

## 1 材料与方法

## 1.1 主要试剂和仪器

新生小牛血清(NBS)、DMEM 培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)和胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司, F-12 培养基购自美国 Gibco 公司,四甲基偶氮唑盐(MTT)购

自华美公司, 内皮素 1 放射免疫检测试剂盒购自解放军总医院科技开发中心放射免疫所。DSP 采用 Stavenow 方法<sup>[3]</sup>制备。

## 1.2 血管平滑肌细胞培养和鉴定

新西兰白兔, 雌雄不限, 体重 2 kg 左右, 12 周龄, 由本校实验动物中心提供。耳缘静脉注射空气处死家兔, 无菌条件下打开胸腔, 取出胸主动脉, 按贴块法培养血管平滑肌细胞。倒置相差显微镜下观察融合的血管平滑肌细胞呈典型“峰和谷”样生长。 $\alpha$ -actin 染色可见胞浆内有阳性产物, 证实确为平滑肌细胞。细胞用 DMEM/F-12 混合培养基(含 10% 灭活小牛血清、100 ku/L 青霉素和链霉素)在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度空气条件下培养, 细胞长至融合, 0.25% 胰蛋白酶消化传代。选择第 5~10 代细胞用于实验。

## 1.3 四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法<sup>[4]</sup>

将单细胞悬液移入 96 孔板( $2 \times 10^4$ /well)。细胞融合后, 分别加入 1:1000、2:1000 和 3:1000 的 DSP, 对照组不加 DSP。每种剂量设平行 6 孔, 继续培养 24 h 后, 每孔加入 20  $\mu$ L 新鲜配制的 MTT 液(5 g/L), 继续培养 4 h, 终止培养, 小心收集上清液(待测内皮素 1), 每孔加 DMSO 150  $\mu$ L, 振荡 20 min, 用 ELISA 仪(北京航空航天大学技术有限公司)于 490 nm 波长处测各孔吸光度值(absorbance, A)。

## 1.4 细胞蛋白测定

将单细胞悬液移入 96 孔板( $2 \times 10^4$ /well)。细胞融合后, 分别加入 1:1000、2:1000 和 3:1000 DSP, 对照组不加 DSP。每种剂量设平行 6 孔, 继续培养 24 h 后, 测细胞蛋白。步骤如下: 小心吸去上清液, 加试剂 A(十二烷基硫酸钠 1 g、氢氧化钠 0.4 g、无水碳酸氢钠 2 g 及酒石酸钠 0.16 g 溶于 100 mL 去离子水中, 充分混匀), 50  $\mu$ L/well, 放入 CO<sub>2</sub> 培养箱内温育 12 h。加入试剂 A 与试剂 B(0.4 g 硫酸铜溶于 10 mL 去离子水)的混合液(50:1), 50  $\mu$ L/well, 然后每孔加入 10  $\mu$ L 酚试剂, 在室温下让颜色充分发展 30 min, 用 ELISA 仪于 490 nm 波长处测各孔 A 值。

## 1.5 流式细胞仪检测

将密度为  $2.5 \times 10^7$  个/L 的单细胞悬液接种于 25 mL 培养瓶内, 每瓶 3 mL, 每组 3 瓶。细胞融合后用无血清培养基驯化 24 h, 实验组加入 2:1000 DSP, 对照组加 2:1000 DMSO, 空白对照加 2:1000 PBS 缓冲液, 继续培养 24 h 后, 胰酶消化、离心、收集细胞, 用流式细胞仪检测(美国 Coulter 公司)。

## 1.6 内皮素 1 含量测定

收集培养液, 4℃离心 10 min(4 000 r/min), 吸取

上清液, 严格按试剂盒操作说明操作,  $\gamma$ -计数器(西安二六二核技术研究所)上测定沉淀放射性计数, 做出标准曲线, 求出样品浓度。

## 1.7 统计学处理

应用 SPSS10.0 统计软件对数据进行分析, 各计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用  $t$  检验和方差分析进行统计分析, 以  $P < 0.05$  表示差异有显著性。

# 2 结果

## 2.1 香烟尘粒对血管平滑肌细胞增殖和蛋白含量的影响

从表 1(Table 1) 可见, 与对照组(不加 DSP 组)比较, 1:1000 和 2:1000 DSP 组 MTT 吸光度值明显增高( $P < 0.01$ ), 3:1000 DSP 组差异无显著性; 各 DSP 组蛋白吸光度值与对照相比差异无显著性( $P > 0.05$ )。

表 1. DSP 对血管平滑肌细胞增殖和蛋白含量的影响。

Table 1. Effects of DSP on the proliferation and protein content of VSMC ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ ).

Groups	MTT absorbance	Protein absorbance
Control	0.417 $\pm$ 0.022	0.237 $\pm$ 0.022
1:1000 DSP	0.481 $\pm$ 0.036 <sup>a</sup>	0.233 $\pm$ 0.025
2:1000 DSP	0.553 $\pm$ 0.041 <sup>a</sup>	0.225 $\pm$ 0.024
3 ml/L DSP	0.421 $\pm$ 0.035	0.219 $\pm$ 0.025

a:  $P < 0.01$ , compared with control group.

## 2.2 流式细胞仪检测结果

从表 2(Table 2) 可见, 2:1000 PBS 组与 2:1000 DMSO 组比较各期 DNA 含量无明显差异( $P > 0.05$ )。与 PBS 组相比, 2:1000 DSP 组 G<sub>1</sub> 期细胞比例明显减少( $P < 0.05$ ), S 期细胞比例明显增多( $P < 0.01$ )。

表 2. 流式细胞术分析 DSP 对细胞周期的影响。

Table 2. Effects of DSP on cell cycle analyzed by flow cytometry ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ , %).

Groups	G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub>
PBS	83.1 $\pm$ 6.2	5.0 $\pm$ 1.7	8.7 $\pm$ 1.5
DMSO	82.5 $\pm$ 6.0	3.5 $\pm$ 1.1	9.6 $\pm$ 2.4
DSP	64.5 $\pm$ 5.9 <sup>a</sup>	24.0 $\pm$ 3.1 <sup>b</sup>	10.5 $\pm$ 2.9

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , compared with PBS group.

## 2.3 香烟尘粒对血管平滑肌细胞分泌内皮素 1 的影响

由表 3 (Table 3) 可见, 与对照组(不加 DSP 组)相比, 1: 1000、2: 1000 和 3: 1000 DSP 作用于血管平滑肌细胞 24 h 后, 培养基中内皮素 1 含量均升高, 尤以 2: 1000 DSP 组升高最明显( $P < 0.01$ )。

表 3. DSP 对血管平滑肌细胞分泌内皮素 1 的影响.

Table 3. Effects of DSP on the amount of ET-1 secreted by VSMC ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ , ng/L).

Groups	ET-1
Control	35.54 ± 6.17
1: 1000 DSP	58.62 ± 9.51 <sup>b</sup>
2: 1000 DSP	89.83 ± 11.02 <sup>b</sup>
3 ml/L DSP	43.21 ± 9.29 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , compared with control group.

3 讨论

吸烟是动脉粥样硬化最重要的危险因素之一。血管平滑肌细胞是动脉粥样斑块中最主要的细胞成分, 各种生长因子、血管活性物质等对血管平滑肌细胞转型、增殖和基质分泌的调节已成为动脉粥样硬化发病机制研究的重要方面<sup>[5]</sup>。四甲基偶氮唑盐是一种淡黄色唑氮盐, 是活细胞线粒体脱氢酶的底物, 经酶催化还原为蓝紫色甲臌(formazan)结晶, 该物质溶解后, 用酶标仪可对其进行检测。甲臌的产生量与细胞的功能状态紧密相关, 活化的细胞要比静止的细胞产生更多的甲臌。研究表明, 受促有丝分裂素刺激的细胞, 单个细胞产生甲臌的量较静止时显著增加<sup>[6]</sup>。

本实验同时结合流式细胞仪检测结果发现, 2: 1000 DSP 具有明显促血管平滑肌细胞增殖的作用, 而且该浓度组培养基中内皮素 1 含量亦显著升高。

内皮素 1 是迄今发现的最强的内源性血管收缩肽, 内皮素 1 的主要靶细胞是血管平滑肌细胞, 并且

对血管平滑肌细胞有强的丝裂原作用。血管平滑肌细胞分泌的内皮素 1 通过自分泌和旁分泌方式发挥作用<sup>[7]</sup>。内皮素 1 与血管平滑肌细胞膜上的 ETA 受体结合后, 通过膜表面 G 蛋白偶联受体和肌醇磷脂系统激活蛋白激酶 C, 再通过 Ras-Raf 通路激活 MAPK, 活化的 MAPK 进入核内激活一系生长相关基因表达, 引起细胞增殖<sup>[8]</sup>。本研究发现, DSP 处理组培养基中内皮素 1 含量增高, 表明 DSP 可促进血管平滑肌细胞分泌内皮素 1, 以 2: 1000 DSP 组作用最明显, DSP 对血管平滑肌细胞分泌内皮素 1 的这种影响, 可能参与了刺激血管平滑肌细胞自身的增殖, 有关机制本课题组将作进一步研究。

在这里, 我们提供一种简便有效的方法, 用 ELISA 仪对 96 孔板上细胞蛋白直接测定。与传统细胞总蛋白测定过程相比, 具有操作简便、灵敏度高、安全和快速等优点。

[参考文献]

[1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362** (6423): 801-809

[2] Shu HP, Bymun EN. Systemic excretion of benzo(a) pyrene in the control and microsomally induced rat: the influence of plasma lipoproteins and albumin as carrier molecules. *Cancer Res*, 1983, **43** (2): 485-490

[3] Stavenow L. Stimulation of collagen secretion by factors released from injured arterial smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis*, 1986, **59** (2): 187-197

[4] 司徒镇强, 吴军正 (主编). 细胞培养. 西安: 世界图书出版社, 1999, 186-188

[5] Raines EW, Ross R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J*, 1993, **69** (S1): S30-37

[6] Mosmann T. Rapid colorimetric assay cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983, **65** (1-2): 55-63

[7] Hahn AW, Resink TJ, Kern F, et al. Effects of endothelin-1 on vascular smooth muscle cell phenotypic differentiation. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992, **20** (S12): S33-36

[8] Hafizi S, Allen SP, Goodwin AT, et al. Endothelin-1 stimulates proliferation of human coronary smooth muscle cells via the ETA receptor and is co-mitogenic with growth factors. *Atherosclerosis*, 1999, **146** (2): 351-359

(此文编辑 文玉珊)