

# 血小板衍生生长因子诱导人血管平滑肌细胞增殖时钙调素的变化

任雨笙\*, 杜荣增, 黄佐, 潘晓明, 樊民, 吴宗贵

(第二军医大学长征医院心血管内科, 上海 200003)

**[摘要]** 目的:观察血小板衍生生长因子(PDGF)对培养的人血管平滑肌细胞增殖及钙调素含量变化的作用。方法:应用<sup>3</sup>H-TdR 掺入法和磷酸二酯酶法,观察不同浓度(1、10、20、30、40 ng/ml)PDGF-BB 对培养的人血管平滑肌细胞 DNA 合成和钙调素含量变化的影响及其时间效应。结果:不同浓度 PDGF-BB 作用后,处于静止状态的人血管平滑肌细胞 DNA 的合成增加,并呈现明显的浓度依赖关系,在 40 ng/ml 浓度时 DNA 的合成达到高峰( $P < 0.01$ )。平滑肌细胞在进入细胞增殖周期后,细胞内钙调素含量逐渐增加,在 9 h 时出现一个短暂的高峰,随后逐渐下降;不同浓度 PDGF-BB 作用后,钙调素含量增加,并呈现出明显的浓度依赖关系,30 ng/ml 浓度时作用最为显著( $P < 0.01$ )。结论:PDGF 可促进培养的人血管平滑肌细胞增殖,该作用可能与增加钙调素含量有关。

**[关键词]** 血小板衍生生长因子;血管平滑肌细胞;细胞增殖;细胞周期;钙调素

**[中图分类号]** R 392.28 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)06-0620-03

## Effects of platelet-derived growth factor BB on proliferation and calmodulin content in human vascular smooth muscle cells

REN Yu-Sheng\*, DU Rong-Zeng, HUANG Zuo, PAN Xiao-Ming, FAN Min, WU Zong-Gui (Department of Cardiovasology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the effects of platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) on proliferation and calmodulin content in human vascular smooth muscle cells (hVSMCs). **Methods:** The hVSMCs were cultured; the effects of PDGF-BB on DNA synthesis and calmodulin content in hVSMCs were assayed at different time points and different concentrations by <sup>3</sup>H-TdR incorporation and phosphodiesterase *in vitro*. **Results:** The DNA synthesis of quiescent hVSMCs was promoted in a dose-dependent manner, with the maximal response at a PDGF-BB concentration of 40 ng/ml at 36 h. Calmodulin level was increased after hVSMCs proliferation and reached a peak at 9 h. The content of calmodulin increased in a dose-dependent manner, with the maximal response at a PDGF-BB concentration of 30 ng/ml. **Conclusion:** PDGF-BB can promote the proliferation of hVSMCs, which may be related to the calmodulin level.

**[KEY WORDS]** platelet-derived growth factor; vascular smooth muscle cells; cell proliferation; cell cycles; calmodulin  
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(6): 620-622]

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)是构成血管壁的主要细胞成分之一,在血管的动脉粥样硬化病变中,增生的 VSMC 是粥样斑块中的重要成分之一。钙调素(calmodulin, CaM)是真核细胞中普遍存在的钙受体蛋白,涉及多种信号途径的转导,在细胞增殖周期中起着重要的调节作用,影响着细胞的增殖及分化<sup>[1]</sup>。血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是体内一种较强的促有丝分裂剂和化学诱导剂,可刺激某些组织细胞的分裂、增殖,与机体组织的生长发育、创伤愈合、动脉粥样硬化以及肿瘤的发生、发展有密切的关系<sup>[2,3]</sup>。

本实验采用培养的人血管平滑肌细胞(hVSMC),观察 PDGF-BB 在促进 hVSMC 增殖过程中对 CaM 含量变化的影响,以了解 PDGF-BB 对 hVSMC 在细胞增殖分化周期中的作用机制。

### 1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器 PDGF-BB、牛脑 CaM (Sigma 公司);胰蛋白酶(进口分装)、DMEM 细胞培养液(Gibco 公司);胎牛血清(FBS, 杭州四季青生物制品公司);YJ-875 超净工作台(苏州市净化设备公司);LS6500 型液体闪烁计数器(Beckman 公司);多头细胞样品收集仪(浙江绍兴东浦医疗仪器厂);Shell-Lab2323 型 CO<sub>2</sub> 孵箱(美国 Sheldon MFG 公司)。

1.2 细胞培养 无菌条件下取人肠系膜下动脉,采用组织贴块法行中层 hVSMC 培养,时差法除去杂细胞。

**[基金项目]** 上海市科技发展攻关计划基金(014119072);上海市自然科学基金(03ZR14029)。

**[作者简介]** 任雨笙(1968),男(汉族),博士,副教授、副主任医师。

\* Corresponding author. E-mail: ys\_ren@citiz.net

胞;待细胞长成峰、谷交错的致密层后,进行传代培养,传第3~8代用于实验。将贴壁生长的hVSMC用0.25%胰蛋白酶消化后,用10% FBS-DMEM将细胞密度调整为 $10^5/\text{ml}$ ,接种于培养瓶中,置 $\text{CO}_2$ 培养箱中孵育24 h,观察细胞贴壁生长情况。

1.3 实验分组 将贴壁生长的hVSMC弃去原培养液,用DMEM培养液洗涤细胞3次,换用0.5%灭活FBS-DMEM继续培养24 h,使细胞同步于 $G_0/G_1$ 期<sup>[4]</sup>。实验分3组:(1)空白对照组,加入1%灭活FBS-DMEM;(2)浓度效应组,同时加入不同浓度的PDGF-BB,使其终浓度分别为1、10、20、30、40 ng/ml,培养24 h(DNA合成)或9 h(CaM含量);(3)时间效应组,PDGF-BB浓度为30 ng/ml,分别培养12、24、36、48 h(DNA合成)或6、9、12、15 h(CaM含量)。

1.4 细胞DNA合成和CaM含量的测定 于培养结束前6 h加入 $1.85 \times 10^4$  Bq/孔的 $^3\text{H}$ -TdR,继续孵育。培养结束后用多头细胞收集仪将细胞收集于玻璃纤维纸上,10%三氯醋酸、无水乙醇、乙醚洗涤,干燥后置于含有5 ml闪烁液的液闪瓶中,在

LS6500型闪烁计数仪上进行放射强度测定。将收集的hVSMC放入苯甲磺酰氨缓冲液中,用超声细胞粉碎仪破膜, $2500 \times g$ 离心5 min。取上清,100℃水浴5 min,冻干备用。用磷酸二酯酶法<sup>[5]</sup>测定样品对磷酸二酯酶的激活能力,由CaM标准品作标准激活曲线,计算待测样品的CaM含量。

1.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用SPSS软件包对数据进行 $t$ 检验、方差分析等处理。

## 2 结果

2.1 PDGF-BB对hVSMC增殖的影响 结果显示,与对照组相比,随着PDGF-BB浓度(1 ng/ml除外)的增加,hVSMC合成DNA的数量也显著增加( $P < 0.01$ ),呈现明显的浓度依赖关系,在40 ng/ml时为最高(图1A)。对照组12 h时hVSMC的 $^3\text{H}$ -TdR掺入值处于相对较低的水平,24 h以后增多,但无明显差别( $P > 0.05$ )。30 ng/ml PDGF-BB作用于hVSMC 12 h时,细胞DNA合成量较对照组无明显差异,随着作用时间的延长,细胞DNA的合成逐渐增多,36 h时达到高峰( $P < 0.01$ ,图1B)。

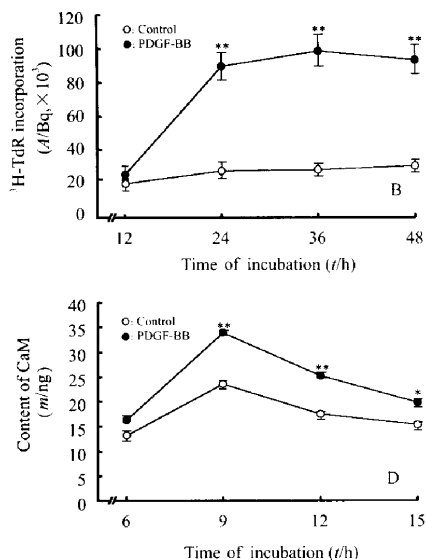
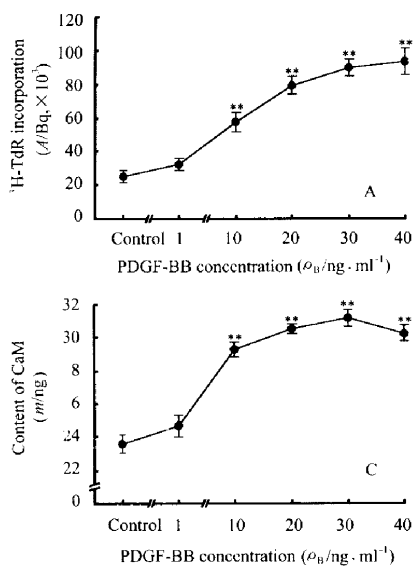


图1 PDGF-BB对hVSMC细胞DNA合成(A,B)及CaM含量的(C,D)的影响

Fig 1 Effect of PDGF-BB on hVSMC DNA synthesis(A,B) and content of calmodulin(C,D) at different time points

A,C: 9 h for incubation; B,D: 30 ng/ml PDGF-BB;  $n=3$  in A and B,  $n=6$  in C and D; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control

2.2 PDGF-BB对hVSMC中CaM含量的影响 结果显示,随着PDGF-BB浓度(1 ng/ml除外)的增高,hVSMC中的CaM含量逐渐增高,30 ng/ml时达高峰( $P < 0.01$ ,图1C)。观察30 ng/ml的PDGF-BB对hVSMC作用不同时间点CaM含量的变化,结果显示,对照组随着hVSMC同步地进入细胞增

殖周期,细胞内CaM含量也开始增加,在9 h时出现一个短暂的高峰,随后细胞内CaM含量逐渐下降,但高于6 h时的CaM水平。30 ng/ml的PDGF-BB可明显促进hVSMC中CaM含量的增加,表现出与对照组相似的变化,且显著高于对照组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ,图1D)。

### 3 讨论

本实验采用细胞培养的方法,观察了 PDGF-BB 对 hVSMC 细胞增殖以及 CaM 含量的影响。为了较精确地观察 hVSMC 在细胞周期中的增殖以及 CaM 含量的变化,实验在加入 PDGF-BB 前,用 0.5% 灭活 FBS-DMEM 培养细胞 24 h,使细胞生长周期同步于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期<sup>[4]</sup>。实验结果显示,PDGF-BB 可明显促进 hVSMC 的 DNA 合成,且在 10~40 ng/ml 的范围内存在着浓度依赖效应。PDGF-BB 促进 hVSMC 的合成还存在着时间效应。在 PDGF-BB 的作用初期,细胞 DNA 合成就开始增加;随着作用时间的延长,细胞 DNA 的合成增多,36 h 达到高峰。DNA 是细胞的遗传物质,DNA 含量的变化代表着细胞的代谢、分裂、生长和遗传的状况,是衡量细胞生命活动的主要指标。PDGF 可明显促进 DNA 的合成,可能通过诱导早期基因如 *c-myc*、*c-fos* 和 *c-jun* 等癌基因的表达,其激活的受体的酪氨酸磷酸化等作用促进细胞的有丝分裂<sup>[6]</sup>,PDGF 还可使处于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期的细胞具有复制 DNA 的潜能,即成为“感受态”细胞,进而在某些其他因子如生长介素 C 的作用下,使 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞进入 S 期而发生有丝分裂<sup>[7]</sup>。实验结果还显示,在 hVSMC 的增殖周期中,CaM 含量增加,在 G<sub>1</sub> 晚期达到高峰,明显早于 hVSMC 的增殖高峰期,随后细胞内 CaM 含量又略有下降,PDGF-BB 可增加 hVSMC 内的 CaM 含量,且呈现出一定的量效关系。CaM 是一种钙受体蛋白,它参与细胞中信号的转导,调节细胞内 Ca<sup>2+</sup> 的浓度以及许多酶的活性。CaM 水平的变化与细胞增殖有密切的关系<sup>[1]</sup>,它可直接影响细胞周期的进程。CaM 含量的增加缩短了 G<sub>1</sub> 期时程,使细胞增殖加速,如果细胞内 CaM 水平一过性降低,则可引起细胞周期的短暂停滞。CaM 在 VSMC 收缩的调节中起着十分重要的作用,VSMC 与心肌、骨骼肌不同,不是以肌钙蛋白作为钙受体,而是以 CaM 或 Leiotonin 作为受体,介导 Ca<sup>2+</sup> 对许多细胞功能的调节。Ca<sup>2+</sup> 与 CaM 结合形成复合物后,可直接激活肌动蛋白使 VSMC 收缩。此外 CaM 还调节细胞 *c-fos* 和 *c-myc* 的表达以及 cAMP 的代谢。我们的研究<sup>[8,9]</sup>表明血管内皮细胞及 VSMC 为 PDGF 的靶细胞,其细胞膜上存在 PDGF 的受体,在有增殖和动脉粥样硬化斑块的血管内皮细胞及 VSMC 上 PDGF 受体表达明显增加,PDGF 可促进 VSMC 的增殖及胶原的合成,并有明显的量效依赖关系及不

同的反应时间性。PDGF 促使细胞内 CaM 含量的增加可能与 VSMC 的增殖以及 VSMC 收缩促进血管痉挛有一定的关系,至于 CaM 在促进细胞增殖和 VSMC 收缩的作用机制还需要进一步研究。

### [参考文献]

[1] Rasmussen CD, Lu KP, Means RL, *et al.* Calmodulin and cell cycle control[J]. *J Physiol Paris*, 1992, 86(1): 83-88.

[2] Hao X, Mansson-Broberg A, Gustafsson T, *et al.* Angiogenic effects of dual gene transfer of bFGF and PDGF-BB after myocardial infarction[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 315(4): 1058-1063.

[3] 任雨笙, 陈强, 贾国良, 等. 血小板衍生生长因子 β 受体在人冠状动脉组织中的表达[J]. 第四军医大学学报, 1998, 19(6): 652-654. Ren YS, Chen Q, Jia GL, *et al.* Expression of β receptor of platelet-derived growth factor in human coronary artery[J]. *Disi Junyi Daxue Xuebao (J Fourth Mil Med Univ)*, 1998, 19(6): 652-654.

[4] Kuga T, Kobayashi S, Hirakawa Y, *et al.* Cell cycle-dependent expression of L- and T-type Ca<sup>2+</sup> currents in rat aortic smooth muscle cells in primary culture[J]. *Circ Res*, 1996, 79(1): 14-19.

[5] 丁文勇, 赵宝昌, 韩旭. 钙调素的内环核苷酸二酯酶检测法[J]. 大连医科大学学报, 1999, 21(1): 3-6. Ding WY, Zhao BC, Han X. Determination of calmodulin by cyclic nucleotide phosphodiesterase method[J]. *Dalian Yike Daxue Xuebao (J Dalian Med Univ)*, 1999, 21(1): 3-6.

[6] Watanabe T, Pakala R, Katagiri T, *et al.* Lysophosphatidylcholine is a major contributor to the synergistic effect of mildly oxidized low-density lipoprotein with endothelin-1 on vascular smooth muscle cell proliferation[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002, 39(3): 449-459.

[7] Clemmons DR, van Wyk JJ. Evidence for function role endogenously produced so matomedin-like peptides in the regulation of DNA synthesis in cultured human fibroblasts and porcine smooth muscle cells[J]. *J Clin Invest*, 1985, 75(6): 1914-1918.

[8] 任雨笙, 崔芳, 贾国良, 等. 血小板衍生生长因子对血管平滑肌细胞增殖及胶原蛋白合成的影响[J]. 心脏杂志, 2001, 13(2): 90-92. Ren YS, Cui F, Jia GL, *et al.* Effects of platelet-derived growth factor on proliferation and collagen protein synthesis of vascular smooth muscle cells[J]. *Xinzang Zazhi (Chin Heart J)*, 2001, 13(2): 90-92.

[9] 任雨笙, 崔芳, 陈强, 等. 猪血小板衍生生长因子的高效液相色谱分析及对血管内皮细胞 DNA 合成的影响[J]. 第二军医大学学报, 2001, 22(2): 155-158. Ren YS, Cui F, Chen Q, *et al.* High performance liquid chromatography analysis of porcine platelet-derived growth factor and its effect on DNA synthesis of human vascular endothelial cells[J]. *Di-er Junyi Daxue Xuebao (Acad J Sec Mil Med Univ)*, 2001, 22(2): 155-158.

[收稿日期] 2003-10-10

[修回日期] 2004-03-18

©1994-2007 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net