

## 周期性应变对血管平滑肌细胞形态和生长的影响

陈道运<sup>1</sup>, 杨向群<sup>1</sup>, 张传森<sup>1\*</sup>, 樊瑜波<sup>2</sup>, 张 喜<sup>1</sup>, 宋锦麟<sup>2</sup>, 何 辉<sup>2</sup>, 李晓宁<sup>2</sup>, 叶 勇<sup>1</sup>

(1. 第二军医大学基础医学部人体解剖学教研室、生物医学工程研究所, 上海 200433; 2 四川大学生物力学研究所, 成都 610065)

**[摘要]** 目的: 研究周期性应变条件下血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)形态和生长的变化。方法: 利用脉动膜式张应力系统, 给VSMCs施加周期性应变, 运用相差显微镜、计算机图像捕获系统及图像处理分析软件观察和分析VSMCs的形态变化; 用<sup>3</sup>HTdR掺入率测定法检测VSMCs的DNA合成变化。结果: VSMCs承受14%的周期性应变后, 细胞发生重排并与应力加载方向垂直, 细胞形态指数减小, 铺展面积、周长、细胞长轴在加载6h时明显增加, 12~24h逐渐减小并趋向于稳定。8%的周期性应变抑制VSMCs生长和DNA合成; 14%的周期性应变使VSMCs生长和DNA的合成明显增加, 24h和48h时其DNA合成分别是对照组的1.4和1.8倍。结论: 周期性应变不但影响VSMC的形变, 且会导致VSMCs的重排。近生理条件下的周期性应变抑制VSMCs的生长, 超生理范围的应变促进VSMCs的生长。

**[关键词]** 周期性应变; 血管平滑肌细胞; 形态指数; DNA合成

**[中图分类号]** R 541.4

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2004)10-1070-04

### Effects of cyclic strain on morphology and growth of vascular smooth muscle cells

CHEN Dao-Yun<sup>1</sup>, YANG Xiang-Qun<sup>1</sup>, ZHANG Chuan-Sen<sup>1\*</sup>, FAN Yu-Bo<sup>2</sup>, ZHANG Xi<sup>1</sup>, SONG Jin-Lin<sup>2</sup>, HE Hui<sup>2</sup>, LI Xiao-Ling<sup>2</sup>, YE Yong<sup>1</sup> (1. Department of Human Anatomy, Institute of Biomedical Engineering, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Biomechanical Institute, Sichuan University, Chengdu 610065)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the effects of cyclic strain on the morphology and growth of vascular smooth muscle cells(VSMCs). **Methods:** A pulsatile membrane cyclic strain system was used to perform cyclic strain on VSMCs from adult SD rats. Microscopy and computer image capture system were used to investigate morphological change in VSMCs. The growth of VSMCs and their DNA synthesis were indicated by <sup>3</sup>HTdR method. **Results:** Under 14% cyclic strain, VSMCs re-aligned gradually and were finally vertical to the direction of stress; the shape index decreased. However, the spreading area, perimeter and long axis of stretched VSMCs increased within 6 h, then decreased to a relatively stable level from 12 to 24 h. The growth and <sup>3</sup>H thymidine incorporation of VSMCs under 8% cyclic strain were arrested, but accelerated under 14% cyclic strain. The <sup>3</sup>H thymidine incorporation had a significant difference in 12 h and increased by 1.4-fold and 1.8-fold in 24 and 48 h respectively compared with control group. **Conclusion:** The cyclic strain not only affects the morphology of VSMCs, but leads to rearrangement of VSMCs. It can inhibit cell growth under physiological condition but promote cell growth beyond physiological condition in cultured VSMCs.

**[KEY WORDS]** cyclic strain; vascular smooth muscle cells; shape index; DNA synthesis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(10): 1070-1073]

\* 血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)的异常增殖是高血压、动脉粥样硬化、血管移植后再狭窄等多种血管重建相关疾病的重要病理特征, 是诸多因素调控和影响的结果, 其中力学因素常常是VSMCs增殖的启动和持续作用因素。在血流动力学环境中, VSMCs主要承受张应力的作用, 张应力作用于血管壁使其产生周期性应变。本实验研究周期性应变对VSMCs生长的影响, 现将结果报告如下。

### 1 材料和方法

#### 1.1 脉动膜式张应力系统工作原理与应力加

载 脉动膜式张应力系统(四川大学生物力学所研制)如图1所示, 其原理是将体外培养的细胞种植在培养膜(硅胶膜厚度100 μm, 香港理工大学赠送)上, 培养膜密闭隔开细胞培养小室与液压小室, 通过直线电机产生的直线磁力线运动作用于模拟心室产生脉动, 利用液体产生的静压或动态交变压力, 使细胞培养膜产生周期性应变。在培养小室的入口端和

\* [基金项目] 国家自然科学基金(39900032)。

[作者简介] 陈道运(1975-), 男(汉族), 硕士生

\*Corresponding author. E-mail: chuansen@yahoo.com

出口端各有一压力传感器和温度传感器, 能够通过测控软件实时监测、控制和采集流体压力梯度、温度的变化和调整硅胶膜的应变量。将培养小室置于 37℃ 含 5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱内加载, 可以保证循环液体温度和培养细胞有稳定适宜的生长环境。通过计算机进行图像捕获, 并完成实时观察和采集存储<sup>[1]</sup>。

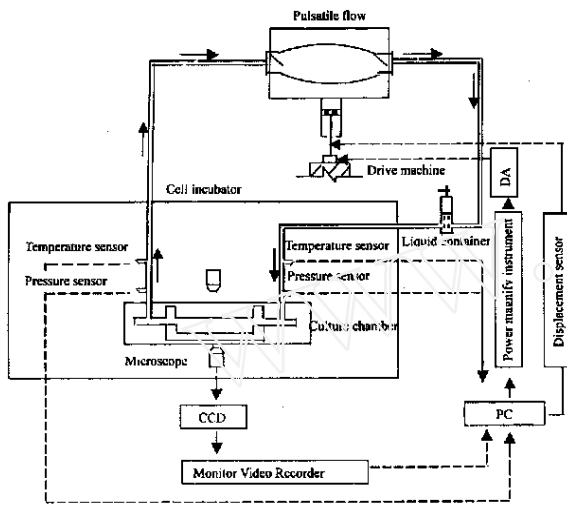


图 1 脉动膜式张应力系统示意图

Fig 1 Schematic diagram of membrane cyclic strain device

1.2 VSMCs 原代培养 取 SD 大鼠 (雄性, 6~7 周龄, 体质量约 200 g, 购自四川大学华西医学中心实验动物中心) 胸主动脉, 采用贴块法进行细胞培养。经 SM  $\alpha$ -actin ( $\alpha$ -actin 购自 Santa Cruz 公司, 免疫组化试剂盒由博士德公司提供) 免疫组织化学

染色鉴定, 传 3~5 代用于实验。

1.3 形态学观察 用 CCD 摄像机 (德国 BASLER 公司) 连接在 Olympus IX70 倒置相差显微镜下摄像, 观察不同应变时间细胞的形态学变化, 并用四川大学自行研制的 CMEIPP 细胞图像处理软件测定细胞的铺展面积、长轴、周长和形态指数 ( $4\pi \times \text{面积} / \text{周长}^2$ )。

1.4 细胞计数 以  $1.2 \times 10^5 / \text{ml}$  浓度每个培养小室接种 3 ml VSMCs 悬液, 静态培养 48 h 后应力加载。在不同的时相点进行消化, 制成细胞悬液后进行细胞计数。

1.5 <sup>3</sup>HTdR 掺入率测定 每个培养小室以  $1.2 \times 10^5 / \text{ml}$  的浓度接种 VSMCs 悬液 3 ml, 静态培养 48 h 施加不同的实验条件后向每个培养小室的培养基内加  $3.7 \times 10^5 \text{ Bq } ^3\text{HTdR}$  静态培养 12 h, 去培养基以 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次, 0.125% 胰蛋白酶消化, 用多头细胞收集器收集细胞于玻璃纤维滤纸, 烘干后用  $\beta$  液闪计数器测定放射性活度。

1.6 统计学处理 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 *t* 检验进行显著性分析。

## 2 结果

2.1 形态学变化 VSMCs 承受 14% 的周期性应变后, 细胞发生重排并与应力加载方向垂直 (图 2), 细胞形态指数减小, 铺展面积、周长、细胞长轴在加载 6 h 明显增加, 12~24 h 逐渐减小并趋向于稳定 (表 1)。

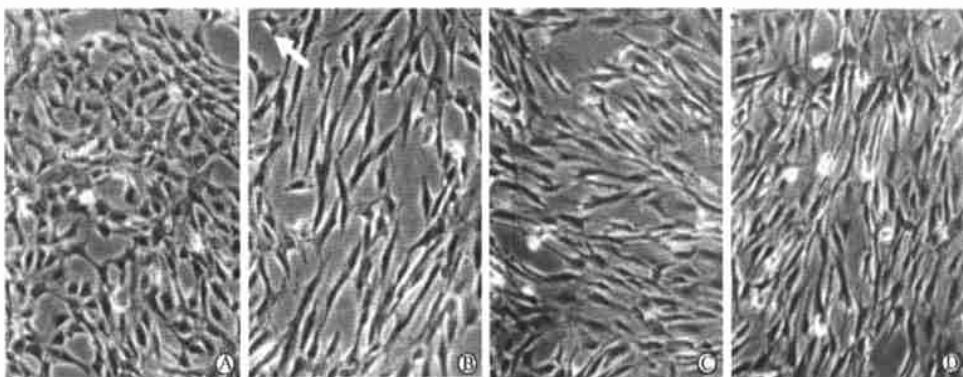


图 2 周期性应变条件 (1 Hz, 14%) 下 VSMCs 的形态变化

Fig 2 Morphology change of VSMCs under 14% cyclic strain ( $\times 115$ )

A: Control; B: Strain 6 h; C: Strain 12 h; D: Strain 24 h; A row indicating strain direction

2.2 应变条件对 VSMCs 生长的影响 与对照组静态培养在硅胶膜上的 VSMCs 相比, 14% 的周期

性应变能明显促进 VSMCs 的生长; 相反 8% 的周期性应变却能明显抑制 VSMCs 的生长 (图 3)。

2.3 VSMCs DNA 合成的变化 从表 2 中可以看出, 应变 14% 组的<sup>3</sup>HTdR 掺入率在加载 12 h 即增加明显( $P < 0.05$ ), 24 h 和 48 h 达对照组的 1.4 和

1.8 倍( $P < 0.001$ )。相反, 加载 8% 应变的 VSMCs 其<sup>3</sup>HTdR 掺入率在 24 h 和 48 h 时明显减小( $P < 0.05, P < 0.001$ )。

表 1 周期性应变条件(1 Hz, 14%) 下 VSMCs 的形态变化  
Tab 1 Morphology change of VSMCs under 14% cyclic strain

Group		Spreading area ( $A/\mu\text{m}^2$ )	Perimeter ( $l/\mu\text{m}$ )	Shape index	Long axis ( $d/\mu\text{m}$ )
Control		166.20 ± 30.34	52.03 ± 6.53	0.78 ± 0.11	36.00 ± 2.06
Strained	6 h	344.19 ± 60.76**	112.96 ± 16.67**	0.34 ± 0.04**	94.84 ± 11.50**
	12 h	168.61 ± 15.34	82.79 ± 11.89**	0.32 ± 0.09**	74.85 ± 10.59**
	24 h	178.62 ± 56.54	82.02 ± 10.47**	0.33 ± 0.07**	75.01 ± 9.74**

( $n = 50, \bar{x} \pm s$ )

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group

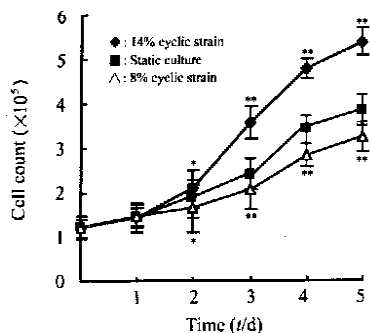


图 3 血管平滑肌细胞的生长曲线

Fig 3 Growth curve of VSMCs

$n = 10$ ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs static culture group

表 2 不同大小的周期性应变对 VSMCs DNA 合成的影响  
Tab 2 <sup>3</sup>H-TdR incorporation of VSMCs under different tension cyclic strain

Group	6 h	12 h	24 h	48 h
Control	653.00 ± 84.51	769.67 ± 97.85	901.00 ± 123.71	1062.66 ± 112.58
Strained(8%)	656.60 ± 125.28	720.17 ± 110.35	747.83 ± 90.46*	782.83 ± 88.85***
Strained(14%)	664.60 ± 107.32	1020.33 ± 211.33*	1284.83 ± 104.90***	1874.83 ± 240.46***

( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  vs control group

本研究发现周期性应变可引起体外培养的 VSMCs 明显形变, 其作用主要表现在两个方面, 一是细胞个体形态的变化, 二是总体细胞的重排。VSMCs 在应力场中的形态学变化可能是细胞对外力作用做出的适应性反应, 一方面通过细胞数量的增加和形态的变化来调整细胞的平均受力, 另一方面是通过总体细胞的重排以适应应力的重新分布, 反映了 VSMCs 为了适应外力的变化在分布上逐渐趋于优化的能力。

关于周期性应变导致 VSMCs 形态学变化的机

### 3 讨论

3.1 周期性应变与 VSMCs 的形变 周期性应变和流体剪切力可引起内皮细胞的明显形变已得到广泛证实, 但力学因素对 VSMCs 细胞形态的影响报道较少。王红兵等<sup>[2]</sup>研究认为, 0.3% ~ 0.7% 基底膜拉伸可引起 VSMCs 的形变, 然而单纯拉伸应变无法模拟在体脉动的生理环境, 且过小应变量也不能反应 VSMCs 在高压情况下甚至生理环境下的受力情况。本文利用脉动模式张应力系统给予 VSMCs 1 Hz, 14% 的周期性应变, 比较接近在体高压情况下 VSMCs 的受力情况。

制目前还不十分清楚, 可能存在的机制有: (1) 影响粘着斑和应力纤维的形成, 从而影响粘着斑和应力纤维的取向与分布, 通过在细胞内张力的再分布调节不同方向的细胞收缩性, 从而影响细胞形态的变化。周期性应变作用于内皮细胞可选择性破坏平行于应变的应力纤维, 保留那些垂直于应变方向的应力纤维, 从而使细胞长轴和应力纤维表现出与应变方向垂直的状态<sup>[3]</sup>, 而在 VSMCs 是否存在类似的机制有待于进一步的研究证实。(2) 生理条件下, 细胞骨架成分是维持细胞形态的重要因素。微管作为

内部支撑构件向外撑开细胞, 以抵抗收缩性微丝产生的张力; 微丝组成的丝网在整个细胞内扩展并施加张力起到弹性绳的作用; 中间纤维则可以看作有力的整合元件将微管和微丝相互连接起来并将它们固定到表面膜和细胞核上<sup>[4]</sup>。

3.2 周期性应变与 VSMCs 增殖 有关应变对 VSMCs 生长的影响国内外报道不一<sup>[5,6]</sup>。为明确周期性应变对 VSMCs 生长的确切作用, 本研究对 VSMCs 分别施加 1 Hz 应变 8% 和 1 Hz 应变 14% 两种不同条件的周期性应变, 前者属于生理范围胸主动脉的应变条件(正常胸主动脉的应变量为 6%~10%), 后者接近高压状态下心主动脉的应变量。

不同的应变条件下, VSMCs 表现出不同的生长活性, 其确切的机制还不清楚, 可能是周期性应变可同时激活细胞增生信号和凋亡信号, 最终的生物学效应取决于两者的平衡。有报道<sup>[7]</sup>应力加载可上调 P21 蛋白的水平来阻止细胞从 G<sub>1</sub> 期向 S 期的过渡。关于增殖信号可能起作用的有第二信使通路<sup>[7]</sup>, 磷酸化激活 MAPKs 信号途径<sup>[8]</sup>以及多种生长因子的作用<sup>[9-12]</sup>。我们的实验结果结合文献表明近生理范围的应变抑制 VSMCs 的生长, 有利于维持正常血管的收缩性和顺应性, 保证血管的通畅; 而超生理范围的应变能促进 VSMCs 的增殖, 导致血管重建及其相关疾病的发生。

## [参考文献]

- [1] 郭欣, 樊瑜波, 宋锦麟, 等. 张应力作用下体外细胞培养膜上应力分布的三维有限元分析[J]. 生物医学工程学杂志, 2002, 19(1): 60-63  
Guo X, Fang YB, Song JL, et al. Three-dimensional finite element analysis cell culture membrane under mechanical load [J]. *Shengwu Yixue Gongchengxue Zazhi (J Biomed Eng)*, 2002, 19(1): 60-63
- [2] 王红兵, 卢晓, 黄岂平, 等. 基底膜拉伸应变对培养的大鼠血管平滑肌细胞形态的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2000, 16(1): 37-40  
Wang HB, Lu X, Huang QP, et al. The effect of membrane cyclic tension strain on the morphology on rat vascular smooth muscle cells *in vitro* [J]. *Zhongguo Yingyong Shenglixue Zazhi (Chin J Appl Physiol)*, 2000, 16(1): 37-40
- [3] Vorotnikov AV, Krymsky MA, Shirinsky VP. Signal transduction and protein phosphorylation in smooth muscle contraction [J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2002, 67(12): 1309-1328
- [4] Bailly M, Condeelis J. Cell motility: insights from the backstage [J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(12): E292-E294
- [5] Standley PR, Stanley MA, Senechal P. Activation of mitogenic and anti-mitogenic pathways in cyclically stretched arterial smooth muscle [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001, 281(6): E1165-E1171.
- [6] Chapman GB, Durante W, Hellums JD, et al. Physiological cyclic stretch causes cell cycle arrest in cultured vascular smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 278(3): H748-H754.
- [7] Mohanty MJ, Li X. Stretch-induced Ca<sup>2+</sup> release via IP<sub>3</sub>-insensitive Ca<sup>2+</sup> channel [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 283(2): C456-C462
- [8] Li C, Hu Y, Mayr M, et al. Cyclic strain stress-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 expression in vascular smooth muscle cells is regulated by Ras/Rac-MAPK pathways [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(36): 25273-25280
- [9] Wilson E, Mai Q, Sudhir K, et al. Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF [J]. *J Cell Biol*, 1993, 123(3): 741-747.
- [10] Li Q, Muragaki Y, Ueno H, et al. Stretch-induced proliferation of cultured vascular smooth muscle cells and a possible involvement of local renin-angiotensin system and platelet-derived growth factor (PDGF) [J]. *Hypertens Res*, 1997, 20(3): 217-223
- [11] Hu YH, Bock G, Wick G, et al. Activation of PDGF receptor  $\alpha$  in vascular smooth muscle cells by mechanical stress [J]. *FASEB J*, 1998, 12(9): 1135-1142
- [12] Iwasaki H, Eguchi S, Ueno H, et al. Mechanical stretch stimulates growth of vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 278(2): H521-H529.

[收稿日期] 2004-04-12

[修回日期] 2004-07-27

[本文编辑] 尹茶

## 欢迎订阅

《第二军医大学学报》

ISSN 0258-879X  
CN 31-1001/R

上海市翔殷路 800 号(邮编: 200433) 邮发代号: 4-373

JOURNAL OF MEDICAL COLLEGES OF PLA ISSN 1000-1948X  
CN 31-1002/R

上海市翔殷路 800 号(邮编: 200433) 邮发代号: 4-725