

碱性纤维母细胞生长因子对血管平滑肌细胞增殖的影响

郭 庆 温 进 坤

(河北医科大学基础医学研究所生物化学室, 石家庄 050017)

Effects of Basic Fibroblast Growth Factor on Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation

GUO Qing and WEN Jin-Kun

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

ABSTRACT

Aim To investigate the effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on the DNA synthesis of vascular smooth muscle cells (VSMC) and the expression of genes related to cell proliferation.

Methods The effects of basic fibroblast growth factor on the DNA synthesis was studied by means of ^3H -TdR incorporation *c-fos*, *c-myc* and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) mRNA were displayed by Northern blot and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) respectively.

Results The results indicated that ^3H -TdR incorporation into VSMC began increased in 6 h after addition of bFGF, and reached a peak in 24 h. VSMC DNA synthesis was induced by bFGF in a dose dependent manner in certain range of concentrations. The maximal expression of proto-oncogenes *c-fos* and *c-myc* mRNA was observed at 1 h after addition of the cytokine. PCNA mRNA expression occurred twice in a cell cycle.

Conclusions Our findings demonstrated that bFGF may significantly stimulate DNA synthesis of VSMC, and suggested that increase in VSMC DNA synthesis was followed by the expression of proto-oncogenes *c-fos* and *c-myc*, which is believed as key step in cell pro-

liferating.

KEY WORDS Basic fibroblast growth factor; Vascular smooth muscle cell; Cell proliferation; Gene expression; Proliferating cell nuclear antigen

摘要 应用 ^3H -TdR 掺入实验, RNA 印迹分析和反转录-多聚酶链反应等方法观察碱性纤维母细胞生长因子对大鼠血管平滑肌细胞 DNA 合成及细胞增殖相关基因表达的影响。结果发现,碱性纤维母细胞生长因子作用于血管平滑肌细胞 6 h 后, ^3H -TdR 掺入开始增加,24 h 达到高峰;在一定浓度范围内,碱性纤维母细胞生长因子对血管平滑肌细胞的促增殖效应与浓度呈正相关。碱性纤维母细胞生长因子作用于血管平滑肌细胞 1 h 后 *c-fos* 和 *c-myc* 表达活性达到高峰,增殖细胞核抗原在一个细胞周期中出现两次表达。本文结果提示,碱性纤维母细胞生长因子可显著促进血管平滑肌细胞的 DNA 合成,证实其作用是通过诱导与细胞增殖有关的基因进行表达来实现的。

关键词 碱性纤维母细胞生长因子; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖; 基因表达; 增殖细胞核抗原

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是以细胞增殖为主的一种病理过程,其中血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)是 As 斑块中最主要的细胞组成^[1,2]。近年来证明,许多细胞因子和生长因子对 VSMC 增殖与分化均具有调节作用。新近发现的碱性纤维母细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)能够诱导中胚层来源的细胞进行分裂增殖。该因子在体内分布广泛,血管内皮细胞和 VSMC 等均可合成^[3]。但目前关于 bFGF 对血管平滑肌细胞的作用及其机制研究尚少。本实验观察 bFGF 对体外培养的大鼠 VSMC 增殖的影响,在细胞水平和分子水平上探讨其可能

的作用机制。

1 材料和方法

1.1 血管平滑肌细胞的培养

用贴块法^[4]培养血管平滑肌细胞。取6~8周龄雄性SD大鼠胸主动脉,剥去内外膜,剪成1 mm²小块,贴于培养瓶内,于37℃用含10%小牛血清的M199 (Sigma)进行原代培养。0.125%胰蛋白酶消化传代。选5~12代细胞用于实验。

1.2 氚标胸腺嘧啶核苷掺入实验

细胞接种于25 ml培养瓶。待细胞生长达80%融合后换成含0.5%小牛血清的培养瓶,饥饿培养24 h,然后换成含10%小牛血清的M199,同时按实验分组分别加入bFGF,观察不同浓度(0、10、20、100和200 μg/L) bFGF作用于血管平滑肌细胞(以浓度为0者作对照组)和同一浓度bFGF(20 μg/L)作用于VSMC不同时间(0、6、12、24和36 h)对VSMC DNA合成的影响。于收集细胞前6 h向各组细胞中加入³H-TdR至终浓度为2 mCi/L,按文献^[5]方法收集细胞,测定³H-TdR掺入值。实验结果以10⁵个细胞中³H-TdR掺入值的均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,差异显著性用 t 检验。

1.3 Northern印迹分析

采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法^[6],分别从对照组细胞和被bFGF(20 μg/L)处理1、3和24 h的细胞中提取RNA。取RNA 20 μg,经1%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分离后,转移到尼龙膜上,按Sambrook^[7]方法与随机引物标记的*c-fos*和*c-myc* cDNA探针进行杂交。

1.4 反转录-多聚酶链反应

反转录-多聚酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)所用引物的核苷酸序列参考文献^[8]报道的大鼠增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA) cDNA序列进行设计与合成。两引物之间的DNA片段长度为282 bp。取上述的RNA 2 μg,按Ungerer等^[9]报告的方法进行反转录,取反转录产物7 μl,加入2 mmol/L dNTP 5 μl,3'和5'引物各50 pmol,用三蒸水将反应体积调整为50 μl,混匀,94℃变性5 min,加Taq DNA聚合酶1 μl(5 unit),用石蜡油覆盖后进行多聚酶链反应。多聚酶链反应条件为94℃变性40 s→50℃复性60 s→72℃延伸60 s,30个循环后72℃延伸10 min。取15 μl扩增产物经7%聚丙烯酰胺凝胶电泳,溴化乙锭染色,紫外灯下观察、照相。

2 结果

2.1 碱性纤维母细胞生长因子对血管平滑肌细胞DNA合成的影响

2.1.1 不同浓度的碱性纤维母细胞生长因子对血管平滑肌细胞DNA合成的影响 实验结果如图1所示,bFGF可明显刺激VSMC的DNA合成($P < 0.05$),且其作用强度与浓度有关。在低浓度时,其作用强度与bFGF浓度呈正相关($r_1 = 0.995$, $P < 0.05$),高浓度时失去相关性($r_2 = 0.787$, $P > 0.05$)。

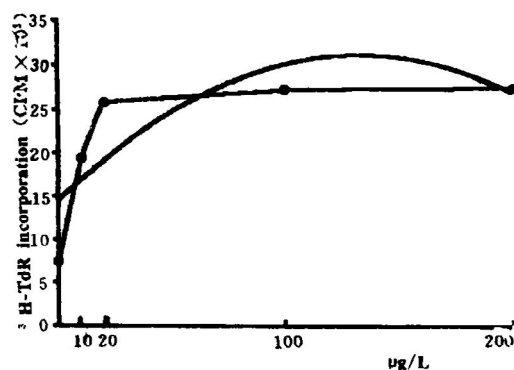


Figure 1. Curve fitting of concentration dependence of bFGF-induced stimulation of ³H-TdR incorporation.

* compared with control group, $P < 0.05$.

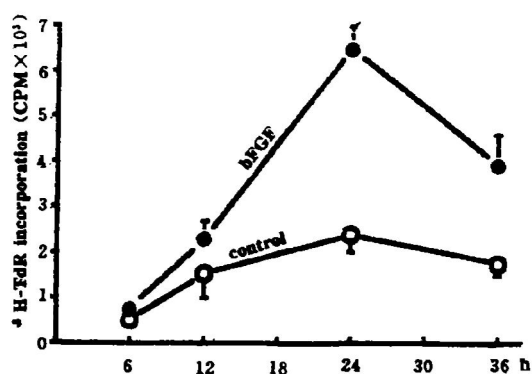


Figure 2. The graph showing the influence of bFGF on ³H-TdR incorporation into rat VSMC treated by bFGF in different time.

2.1.2 碱性纤维母细胞生长因子作用不同时间对DNA合成的影响 实验结果如图

2 所示, bFGF 作用于 VSMC 6 h, ^3H -TdR 掺入量开始增加, 24 h 达到高峰, 36 h 明显降低。

2.2 碱性纤维母细胞生长因子对 *c-fos* 和 *c-myc* 表达的影响

从对照组和被 bFGF 处理的细胞中提取的 RNA 与 *c-fos* 和 *c-myc* 探针杂交后, 分别在靠近 18S rRNA 的位置上出现一条杂交带, 从杂交信号的强度可知, *c-fos* 和 *c-myc* 在 bFGF 作用 1 h 的 VSMC 中表达最高, 3 h 减弱, 24 h 恢复到对照水平 (Figure 3)。

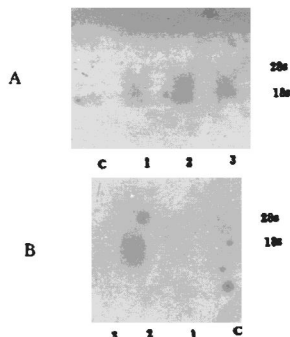


Figure 3. Northern blot showing the expression of *c-fos* and *c-myc* mRNA induced by bFGF in rat VSMC. A: total RNA hybridized with *c-fos* cDNA probe; B: total RNA hybridized with *c-myc* cDNA probe. C: control; 1: 1 h; 2: 3 h; 3: 24 h.

2.3 碱性纤维母细胞生长因子对增殖细胞核抗原表达的影响

反转录-多聚酶链反应 (RT-PCR) 产物经 7% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后在相当于 300 bp 左右的位置上出现一条明显的条带, 其长短与预期结果相一致。从带的亮度提示, bFGF 作用于 VSMC 1 h 后 PCNA mRNA 表达增强, 3 h 减弱, 24 h 再次加强 (Figure 4)。

3 讨论

碱性纤维母细胞生长因子 (bFGF) 对中胚

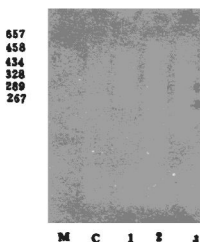


Figure 4. RT-PCR showing the expression of PCNA mRNA induced by bFGF in rat VSMC. M: marker; C: control; 1: 1 h; 2: 3 h; 3: 24 h.

层和神经外胚层来源的细胞具有促有丝分裂作用, 因此被认为在 As 和血管损伤过程中参与 VSMC 增殖的调节^[10]。本研究通过观察不同浓度的 bFGF 作用于同一时间血管平滑肌细胞和同一浓度的 bFGF 作用于不同时间 VSMC 对 DNA 合成的影响, 发现 bFGF 能显著促进 VSMC 的 DNA 合成, 且在一定浓度范围内, 其对 VSMC 的促增殖效应与浓度呈正相关, 在高浓度时, 出现饱和性。据文献^[11]报道, 大鼠 VSMC 的细胞周期约为 24 h。本实验观察到, bFGF 作用于 VSMC 6 h 时细胞对 ^3H -TdR 的摄取开始增加, 24 h 达到高峰。提示 bFGF 对 VSMC 的促增殖作用是使进入细胞周期的细胞数量增加而不是改变 VSMC 的细胞周期。36 h 后 ^3H -TdR 掺入减少的原因可能与大部分 VSMC 完成一次细胞分裂, 尚未进入下一细胞周期的 S 期有关。在所观察的时间内, 未经 bFGF 处理的 VSMC DNA 合成也呈现增加趋势的原因可能与饥饿培养 24 h 使细胞进入静止期后, 加入含小牛血清的培养液, 细胞也进入增殖状态有关。

原癌基因 *c-fos* 和 *c-myc* 所编码的蛋白质是调控基因转录的反式作用因子, 它们通过与顺式作用元件结合可以促使与细胞增殖启动有关的基因进行表达。本文结果表明, 在未经

bFGF 处理的细胞内, *c-fos* 和 *c-myc* 基因表达活性很低, VSMC 被 bFGF 处理 1 h 后, *c-fos* 和 *c-myc* 表达均达到高峰, 提示 bFGF 可诱导 VSMC 中与细胞增殖有关的原癌基因进行表达。

增殖细胞核抗原(PCNA)作为 DNA 聚合酶 δ 的辅助因子, 参与细胞 DNA 合成及细胞周期的调节。已经证实, PCNA 只在处于增殖状态的细胞中进行表达^[12]。本研究提示, bFGF 作用于 VSMC 1 h 后, PCNA 表达增加, 24 h 后再次出现表达, 说明 bFGF 可诱导 PCNA 在一个细胞周期中出现两次表达。关于原癌基因激活与 PCNA 表达之间的关系尚待进一步研究。

参考文献

1. Nochols K, Krantis A, Stains W, et al. Histochemical location of nitric oxide-synthesizing neurons and vascular site in the guinea-pig intestine. *Neuroscience*, 1992, **51** (4): 791~799.
2. 汤键, 周爱儒. 原癌基因与心血管疾病. 北京: 北京医科大学 中国协和医科大学联合出版社, 1990: 150~158.
3. Lindner V, Lappi D, Baird A, et al. Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. *Circ Res*, 1991, **68**(1): 106~113.
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**: 1113~1117.
5. 胡静, 温进坤, 魏素珍, 等. 甲基硝基亚硝基胍对血管平滑肌细胞增殖的影响. *中华物理医学杂志*, 1994, **16**: 14~16.
6. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step methods of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Ann Biochem*, 1987, **162**: 156~159.
7. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T, et al. *Molecular Cloning*, 2nd ed. New York: CSH, 1989.
8. Morishita R, Gibbons G, Ellison K, et al. Single intraluminal delivery of antisense *cdc2* kinase and PCNA oligonucleotides result in chronic inhibition of neointimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 474~478.
9. Ungerer M, Bohm M, Elce J, et al. Altered expression of β -adrenergic receptor and β_1 -adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation*, 1993, **87**: 454~463.
10. Rogelj S, Weinberg RA, Fanning P. Basic fibroblast growth factor fuse to a peptide transforms cells. *Nature*, 1988, **331**(14): 173~175.
11. Watson M, Venence S, Pang S, et al. Smooth muscle cell proliferation. *Circ Res*, 1993, **73**: 109~117.
12. 刘志红, 黎磊石, 胡伟新, 等. 大黄素对肾小球系膜细胞 PCNA 的影响. *细胞生物学杂志*, 1993, **15** (2): 174~176.

(1996-06-14 收到, 1996-09-01 修回)