

· 综 述 ·

概述平滑肌细胞培养特性及缺氧和衰老对其影响

沈丹彤 傅向阳 黄巧冰

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖及转化在肺动脉高压、高血压、动脉粥样硬化及冠状动脉成形术后再狭窄等的形成过程中具有重要的作用。急慢性缺氧均可导致肺动脉高压, 而 VSMC 在肺血管结构重建中起了重要的作用。流行病学研究表明, 衰老在动脉粥样硬化的发展中是一个独立的危险因素, 它在许多心血管疾病的进展中扮演重要角色。许多实验结果表明, 因衰老相关的机体生物学的改变, 导致了老年动物的血管损害比年轻动物有更高的概率和更严重的程度。

1 VSMC 的培养方法

VSMC 的体外培养始于 20 世纪 70 年代, 由 Ross 和 Campbell 采用贴块法获得成功。目前 VSMC 培养方法主要有两种: 贴块法和酶离法。在一般对 VSMC 损伤、缺氧、增殖等研究中, 多采用贴块法, 简单易行, 为大多数实验所应用^[1]。胡德辉等应用改进的贴块法培养肺内小动脉 VSMC 获得成功, 建立了肺内小动脉 VSMC 的培养方法。王关嵩等^[2]用消化贴块法成功培养大鼠的细小动脉 VSMC, 该方法纯度高, 方便可行。酶离法多用于初期培养, 旨在获得形态容易鉴别且具有收缩性的分离 VSMC。为获得收缩型细胞, 接种浓度为 $1 \times 10^7/L$, 若使大多数细胞在培养过程中长期保持收缩型, 细胞接种浓度应 $< 5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8/L$; 接种浓度为 $< 5 \times 10^6/L$ 时, 培养细胞则为合成型而非收缩型。为研究内皮细胞 (endothelial cell, EC) 与 VSMC 间的相互关系, 最初人们简单地将两种细胞按一定的比例混合培养, 这种方法既不能反映生理状态下两种细胞的生长结构关系, 也不易将两种细胞分离研究。以后, 人们对联合培养模型做了很多

改进, 这方面比较突出的工作是 1997 年 Mark 将多孔聚对苯二甲酸乙酯 (polyethylene terephthalate, PET) 膜作为 EC 联合培养的载体, 将 EC 和 VSMC 分别种植在膜的两侧, 较好地模拟了在体条件下 EC 与 VSMC 之间生理结构层次关系和相互作用的方式^[3]。实验动物一般为牛、兔、大鼠、猪等。人动脉 VSMC 的培养方法也比较成熟, 材料通常为水囊引产胎儿, 既可应用贴块法, 也可以应用胶原酶分离法。

2 VSMC 的分型及转化

VSMC 呈梭形, 富含肌丝, 有突起, 由间质细胞分化而来, 它介于骨骼肌细胞和成纤维细胞之间, 是成纤维细胞的近源细胞。与骨骼肌不同, 它的肌丝不形成肌原纤维, 而是散在分布, 附着于密体和密斑上。VSMC 具有两种不同的表型, 分别称为收缩型和合成型, 可用电镜和免疫组化加以鉴别。两种表型之间存在过渡型细胞, 在一定条件下 VSMC 的两种表型可以互相转化。收缩型和合成型的差别在于, 收缩型 VSMC 胞质内含丰富的肌丝及密体, α -肌动蛋白含量多; 合成型 VSMC 胞质内含肌丝较少, 缺乏收缩能力, 但胞浆内参与生物合成的内质网及高尔基体的含量较多, 其移行、增殖、分泌能力强, 能分泌血小板源性生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 或 PDGF 样活性物质, 且对分裂因子和血管源性生长因子敏感。体外培养的 VSMC 呈独特的“谷-峰”样生长。它的表型取决于接种 VSMC 细胞的密度。对于酶解离的原代 VSMC 来说, 若接种密度高达足以铺满瓶底时, 则 VSMC 呈收缩型; 若接种密度较低, 则培养的 VSMC 将从收缩型转化为合成型, 并增值; 连续分裂 > 5 次, VSMC 将保持合成型, 不再转化为收缩型^[4]。

3 缺氧对 VSMC 培养的影响

对于在体的肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMC) 的增殖受多种因素的影响, 而体外培养的 PASMC 能否耐受缺氧,

作者单位: 510282 广州, 第一军医大学珠江医院心内科 (沈丹彤, 傅向阳); 510515 广州, 第一军医大学全军休克微循环重点实验室 (黄巧冰)

作者简介: 沈丹彤, 男, 医学硕士

通讯作者: 沈丹彤, 电话: 13068831454, E-mail: shendantong@hotmail.com

缺氧能否引起 PASMC 形态变化及增殖尚存在争议,缺氧刺激 PASMC 增殖的研究报道不尽一致。Benitz 等研究表明缺氧抑制体外培养的胎儿 PASMC 的增殖。Dempsey 等指出缺氧不影响 PASMC 的增殖,PKC 激活的 PASMC 才能直接感受缺氧并增殖。然而,后来大多研究都不支持 Dempsey 的观点,例如,罗兰等发现缺氧能直接刺激牛 PASMC 增殖;并且近几年的研究大多支持缺氧直接刺激 PASMC 增殖的观点,目前这观点也被广大学者所公认^[5]。Ambalavanan 等^[6]则指出 5%~10% 的氧浓度能最大促进 PASMC 增殖。刘健等^[7]观察了缺氧对体外培养的肺动脉平滑肌细胞形态及增殖的影响,表明缺氧早期 PASMC 增殖受抑制,>12h PASMC 则发生表型转换和增殖。

肖芳等研究则表明,缺氧可刺激猪肺动脉内皮细胞表达 bFGF,缺氧猪肺动脉内皮细胞条件培养液通过 bFGF,使肺动脉平滑肌细胞表达 bFGF。实验观察到体外培养的 PASMC 可以耐受低氧,但与常氧条件下的生长状况不同,这可能一方面因缺氧刺激产生糖酵解途径的酶;另一方面缺氧可能刺激 PASMC 产生了 PDGF 等生长因子,说明低氧可以直接使培养的 PASMC 增生。实验证明,低氧性肺动脉高压大鼠肺组织 PDGF-A-B 链 mRNA 表达增加,体外实验证明低氧可直接刺激 PASMC 的 PDGF-B 链 c-sis 基因表达。由此可推测,体外缺氧也可直接激活 PASMC,促进 PASMC 自身增殖。Platoshyn 等^[8]和 Cornfield 等^[9]发现缺氧影响 K^+ 通道活性使钙内流增加。缺氧可促进肺动脉平滑肌细胞 Ca^{2+} 内流,从而使胞内 $[Ca^{2+}]$ 升高^[10]。此外,急性缺氧时 PASMC 的 cAMP 和 cGMP 均升高。说明可能是缺氧引起胞内 ATP 缺乏,从而使内质网钙泵摄 Ca^{2+} 能力减弱,同时激活磷脂酶 C 产生三磷酸肌醇,而三磷酸肌醇可作用于内质网膜的受体,促使钙释放。 Ca^{2+} , cAMP 和 cGMP 均是细胞内重要的第二信使,缺氧除了可能诱生 PDGF 外,还可能通过调节第二信使系统发挥作用^[11]。

还有实验证明,在慢性缺氧条件下,肺动脉 VSMC 增殖过程中不伴有凋亡水平的显著变化,提示肺动脉平滑肌细胞增殖是导致肺血管重塑的直接原因。大量研究还证实,JNK/SAPK 信号传递途径在细胞缺氧等应激反应中起重要作用^[12]。JNK/SAPK 信号传递途径的激活促进细胞凋亡发生,其机制与诱导 FasL 表达、调控凋亡相关基因差异表达、改变细胞内 Ca^{2+} 环境、激活胱冬肽酶(caspases)

家族有关^[17];在某些情况下,JNK/SAPK 信号传递途径的激活并不导致细胞凋亡,相反还可能与细胞增殖有关。JNK/SAPK 信号传递途径在细胞应激反应中的作用表现出复杂性和多样性。

4 衰老对 VSMC 培养的影响

关于衰老对于 VSMC 影响的研究,基本集中于对大动脉的损伤及粥样硬化等的领域。以往实验说明,老年动物的血管对血管损伤有剧烈反应,而且通过将老年和年轻动物的血管移植到不同年龄的宿主,发现与年龄相关的对损害的反应不同,乃是血管自身所致,与宿主的年龄无关。多数实验也都证明了老年动物体外培养的 VSMC 增生比年轻动物活跃,如 Hariri 及 McCaffrey 等研究所见;分离培养球囊损伤后 2~4d 天动脉的 VSMC,发现老年大鼠的 VSMC 比年轻大鼠有更高的增殖水平;然而也有一些不同的实验结果,如 Urano 等^[13]分离培养球囊损伤后 14d 动脉的 VSMC,发现损伤后年轻大鼠的 VSMC 比老年大鼠有更高的增殖水平,而未损伤组年轻大鼠与老年大鼠的 VSMC 增殖水平无明显差异。

McCaffrey 等研究了转化生长因子等抑制生长的细胞因子对老年动物 VSMC 的增殖的抑制,发现即使在没有丝裂原存在的条件下,PDGF 对老年动物 VSMC 的增殖有促进作用;Alain Rivard 等的研究表明,老年兔与年轻兔的 VSMC 相比,有着更高的 c-fos 基因活性和细胞周期蛋白 A 的更高表达。另外有研究表明,从老年动物血管分离出来的 VSMC 比年轻动物的更快地转化为合成型细胞。有实验证实,新生哺乳动物的血管构型在出生后可因血流、压力等因素的影响而发生重塑,在重塑过程中,VSMC 发生增生和低水平的凋亡;随动物年龄的增加,血管重塑减少,平滑肌细胞的增生和凋亡率亦随之下降^[14]。细胞凋亡与衰老密切相关,它就是机体衰老过程中具体到细胞水平的体现^[15]。凋亡信号是通过一系列细胞信号传导系统而被细胞接受的,它与细胞增殖信号交错形成复杂的网络,最终结局还需调节系统的调节。许多研究结果已经表明,原癌基因 c-myc 和 c-fos 的表达对于细胞凋亡的启动可能是必需的,作为调控系统的一员,细胞中也存在抑制凋亡的原癌基因如 bcl-2,它只抑制细胞凋亡,但不像 c-myc 和 c-fos 那样可以刺激细胞增殖^[16]。许多实验亦证实衰老等原因导致细胞的凋亡中胱冬肽酶扮演了重要的角色^[17]。细胞凋亡包

括膜的破裂、蛋白降解,以及细胞核的皱缩和染色体 DNA 的降解,介导凋亡表征出现的主要是能自身激活放大的胱冬肽酶蛋白酶家族,其中胱冬肽酶-3 与细胞核内的凋亡表征有关^[18]。

5 讨论

目前,VSMC 的培养方法已经比较完善和简单易行,主要的工作是针对自己的研究选择培养方法并加以改进。关于 VSMC 的分型和转化的研究的深入,特别令人关心的是其机制尚且未清楚,因为这关系到临床上介入治疗的预后和动脉粥样硬化的发展过程。VSMC 缺氧的过程是一个信号传导发生急剧变化的过程,其机制对于解释肺动脉高压的进展特别有贡献,所以也是一个热点问题。衰老对于 VSMC 是一个很重要的独立因素,老年血管对于刺激的反应更为剧烈,其机理对于解释衰老过程和 VSMC 的信号传导机制非常重要。以上所说的许多问题还有待于解决,对于细胞内信号传导机制的研究最终会给人满意解释。

参考文献

- 1 Rivard A, Principe N, Andres V. Age-dependent increase in c-fos activity and cyclin A expression in vascular smooth muscle cells. A potential link between aging, smooth muscle cell proliferation and atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 2000, 45: 1026-1034.
- 2 王关嵩,钱桂生,李淑平,等.大鼠细小动脉平滑肌细胞分离培养的新方法. *中国临床解剖学杂志*, 2000, 18: 282-283.
- 3 Fillinger MF, Sampson LN, Cronenwet JL, et al. Co-culture of endothelial cells and smooth muscle cells in bilayer and conditioned media models. *J Surg Res*, 1997, 67: 169-178.
- 4 Lundberg S, Crow T. Age-related changes in the signaling and function of vascular smooth muscle cells. *Exp Gerontol*, 1999, 34: 549-557.
- 5 陶清国,张珍祥. c-myc 反义寡核苷酸对缺氧内皮细胞条件培养液刺激的肺血管平滑肌细胞增殖的影响. *中华结核和呼吸杂志*, 1998, 21: 157-159.
- 6 Ambalavanan N, Bulger A, Philips JB III. Hypoxia-induced release of peptide growth factors from neonatal porcine pulmonary artery smooth muscle cells. *Biol Neonat*, 1999, 76: 311-319.
- 7 刘健,罗德成,王培勇,等.缺氧对体外培养的肺动脉平滑肌细胞形态及增殖的影响. *中国应用生理学杂志*, 1997, 13: 110-113.
- 8 Platoshyn O, Yu Y, Golovina VA, et al. Chronic hypoxia decreases K(V) channel expression and function in pulmonary artery myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 280: L801-L812.
- 9 Cornfield DN, Saqueton CB, Porter VA, et al. Voltage-gated K(+) -channel activity in ovine pulmonary vasculature is developmentally regulated. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 278: L1297-L1304.
- 10 Cornfield DN, Stevens T, Mc Murtry IF, et al. Acute hypoxia causes membrane depolarization: a calcium influx in fetal pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 1994, 266(4pt1): L1469.
- 11 王关嵩,钱桂生,陈维中.缺氧对大鼠肺动脉平滑肌细胞的作用机制. *高原医学杂志*, 2000, 10: 6-8.
- 12 Lin Z, Weinberg JM, Malhotra R, et al. GLUT-1 reduces hypoxia-induced apoptosis and JNK pathway activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000, 278: E958-E966.
- 13 Urano Y, Shirai K, Watanabe H, et al. Vascular smooth muscle cell outgrowth, proliferation, and apoptosis in young and old rats. *Atherosclerosis*, 1999, 146: 101-105.
- 14 Lockshin RA, Facey CO, Zakeri Z. Cell death in the heart. *Cardiol Clin*, 2001, 19: 1-11.
- 15 王新玲,李月彩,侯颖春.自由基、细胞凋亡与衰老关系的研究进展. *中国老年学杂志*, 1999, 19: 252-253.
- 16 Erhterae D, Platoshyn D, Krick S, et al. Bcl-2 Decreases voltage-gated K⁺ channel activity and enhances survival in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 281: C157-165.
- 17 Orlandi A, Marcellini M, Pesce D, et al. Propionyl-L-carnitine reduces intimal hyperplasia after injury in normocholesterolemic rabbit carotid artery by modulating proliferation and caspase 3-dependent apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 2002, 160: 81-89.
- 18 McCarthy NJ, Bennett MR. The regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis. *Cardiovasc Res*, 2000, 45: 747-755.

(收稿日期:2002-04-18)

(本文编辑 李棉生)