

平滑肌细胞源性生长因子对 NIH 3T3 纤维母细胞 DNA 合成的影响

同济医科大学病理学教研室 杨仕林* 邓仲端 瞿智龄

摘要 动脉中膜平滑肌细胞(SMCs)迁移进入内膜和增生是动脉粥样硬化发生的关键环节,并受包括 PDGF、IGF、FGF、EGF 在内的多种因素的影响。众所周知,SMCs 自身亦可合成及分泌生长因子。本研究以平滑肌细胞条件培养基及平滑肌细胞粉碎物作为生长因子的来源,观察其对³H-TdR 掺入 NIH 3T3 细胞 DNA 的影响,结果提示两者均促进 NIH 3T3 细胞 DNA 的合成,说明平滑肌细胞合成的生长因子部分被分泌到细胞外并可与其自身细胞膜上的生长因子受体结合,部分保留在细胞内促进其自身的增生。

关键词 平滑肌细胞; 生长因子; 纤维母细胞; 动脉粥样硬化

动脉中膜平滑肌细胞(smooth muscle cells, SMCs)增生在动脉粥样硬化斑块的发生发展中起重要作用。体外细胞培养发现多种细胞生长因子如 PDGF、IGF、FGF、EGF 等,均明显促进 SMCs 的增生^①。近年来的研究证明,SMCs 可通过自分泌方式产生多种细胞生长因子,如 PDGF 样生长因子,IGF 样生长因子、EGF 样生长因子,1988 年 Morisaki 报道^②,培养的 SMCs 可分泌一种不同于其他已知细胞生长因子的生长因子,称之为平滑肌细胞源性生长因子(SMCs-derived growth factor, SDGF)。

SMCs 可合成及分泌多种细胞生长因子,但这些生长因子是全部被分泌到细胞外抑或是在细胞内发挥作用,目前尚不完全清楚;本实验的目的是以平滑肌细胞条件培养基(SMCs-conditioned medium, SMCs-CM)及平滑肌细胞粉碎液(SMCs-sonicate, SMCs-son)作为生长因子的来源,观察其对 NIH 3T3 纤维母细胞 DNA 合成的影响,说明 SMCs 合成的细胞生长因子的去处。

1 材料及方法

1.1 兔主动脉中膜 SMCs 培养 无菌条件下取 4~6 周龄的日本大耳白兔主动脉,用组织贴块

法进行原代细胞培养^③,培养基为含 10%胎牛血清的 M199 培养基(Gibcco 公司),待细胞长满瓶壁时,用 0.01%胰蛋白酶消化、传代。

1.2 SMCs-CM 的制备 上述兔主动脉 SMCs,在传至第四代后,且细胞长满 80%培养瓶壁,弃去培养基,用 D-Hanks 缓冲液洗涤三遍,加入无血清培养基(DME/F12 混合培养基, Sigma 公司),继续培养 48 小时,收集此培养基并过滤除菌,即为 SMCs-CM^④。

1.3 SMCs-son 的制备 上述传至第四代的 SMCs, D-Hanks 缓冲液洗涤后,胰蛋白酶消化、分散、计数细胞, D-Hanks 缓冲液洗涤细胞三次,以无血清培养基制成细胞悬液,超声细胞粉碎机粉碎细胞,即为 SMCs-son。

1.4 NIH 3T3 纤维母细胞 DNA 合成分析 采用³H-TdR 掺入法^⑤,兹简述如下:生长状态良好的 NIH 3T3 细胞,用 0.01%胰蛋白酶消化分散,计数,以无血清培养基制成细胞悬液,分种于 24 孔及 96 孔细胞培养板,细胞接种浓度分别为 3×10^4 /ml 及 7.5×10^4 /ml,细胞接种的量分别 1ml/孔及 0.2ml/孔,分别用于观察 SMCs-CM 及 SMCs-son 对 NIH 3T3 细胞 DNA 合成的影响。培养 24 小

* 第一作者现通信地址:武汉、广州军区武汉总医院心脏内科 邮编:430070

时后,弃去培养基,缓冲液洗涤,24孔培养板加 SMCs-CM,1ml/孔,对照组加无血清培养基,对照组及实验组分别设3个观察孔。96孔培养板分别加 SMCs-son 40 μ l、60 μ l、80 μ l三个梯度组,余用无血清培养基补足0.2ml/孔,对照组及实验组各设6个观察孔。继续培养20小时,然后加³H-胸腺嘧啶核苷(³H-Thymidine,³H-TdR,中国科学院原子能研究所),使终浓度为1ml/孔(24孔培养板)及0.5ml/孔(96孔培养板),继续培养6小时,去培养基,缓冲液洗涤,加入0.1mol/L NaOH 0.5ml/孔(96孔培养板加0.2ml/孔),使细胞破碎,然后将细胞破碎液加入闪烁液中,FJ2107G型液体闪烁计数器检测其放射比活度。

2 结果

1.1 SMCs-CM对³H-TdR掺入NIH 3T3细胞DNA的影响 从³H-TdR掺入NIH 3T3细胞DNA的放射比活度测定结果看,SMCs-CM可显著促进³H-TdR掺入NIH 3T3细胞DNA中,亦即可促进DNA的合成,其掺入的量约为对照组的3倍(图1)。

1.2 SMCs-son对NIH 3T3细胞DNA合成的影响 SMCs-son对NIH 3T3细胞DNA合成的影响,从实验结果(图2)看,40 μ l及60 μ l梯度组SMCs-son并不引起³H-TdR掺入增加,80 μ l组可明显促进³H-TdR掺入NIH 3T3细胞DNA中,经统计学处理(student t test, n=6),其与对照组、40 μ l及60 μ l组均无显著性差别,它促进³H-TdR掺入的量约为对照组的2倍。

3 讨论

体外培养的SMCs可通过自分泌或/和旁分泌方式合成及分泌多种细胞生长因子,并在不同程度上刺激SMCs、血管内皮细胞及纤维母细胞增生^②。

本实验结果提示SMCs-CM及SMCs-son均能促进³H-TdR掺入NIH 3T3细胞DNA中,说明SMCs-CM及SMCs-son均含有一种或多种细胞生长因子。同时亦提示SMCs合成的生长因子部分被分泌到细胞外,部分却与细胞自身表面的受体结合而被摄入或不被分泌到细胞外,这提示SMCs合成的某些生长因子可能只是为了满足细胞本身增生的需要。1989年Daughaday等报道^⑧,SMCs合成FGF无信号肽,为非分泌蛋白,这一证据支持

上述观点。

在SMCs-son促³H-TdR掺入NIH 3T3细胞DNA试验中,可见40 μ l及60 μ l组对NIH 3T3细胞DNA合成没有影响,提示在此两组细胞内生长因子的含量尚未达到足以促进DNA合成的浓度。

SMCs的增生对动脉粥样硬化的发展有促进作用,SMCs合成的生长因子一部分不被分泌到细胞外,似可说明,SMCs即使无外来的生长因子存在(旁分泌作用所致)仍可保持其增生状态,这对于动脉粥样硬化的形成及发展具有重要的意义。

参考文献

1. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, et al. The pathogenesis of atherosclerosis. An Overview. Clin Cardiol 1991;14(suppl 1):1~16
2. 杨仕林. 平滑肌细胞源性生长因子. 国外医学生理、病理与临床科学分册 1992;12(3):142~144
3. Morisaki N, Koyama N, Mori S, et al. Effects of smooth muscle cell derived growth factor (SDGF) in combination with other growth factors on smooth muscle cells. Atherosclerosis 1989;78(1):61~63
4. 朱闰红,等. 培养的动脉粥样硬化兔动脉平滑肌细胞产生单核细胞趋化因子. 中国循环杂志 1991;6(3):216
5. Koyama NK, Oshikawa T, Morisaki N, et al. Secretion of a potent new migration factor for smooth muscle cells (SMC) by cultured SMC. Atherosclerosis 1991;86(2,3):219
6. Dempsey EC, Stenmark KR, McMurtry IF, et al. Insulin-like growth factor I and protein Kinase C activation stimulate pulmonary artery smooth muscle cell proliferation through separate but synergistic pathways. J Cell Physiol 1990;144(2):159~165
7. Sarzani R, Brecher P, Chobanian AV. Growth factor expression in aorta of Normotensive and hypertensive rats. J Clin Invest 1989;83(4):1404~1408
8. Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, Messenger Ribonucleic

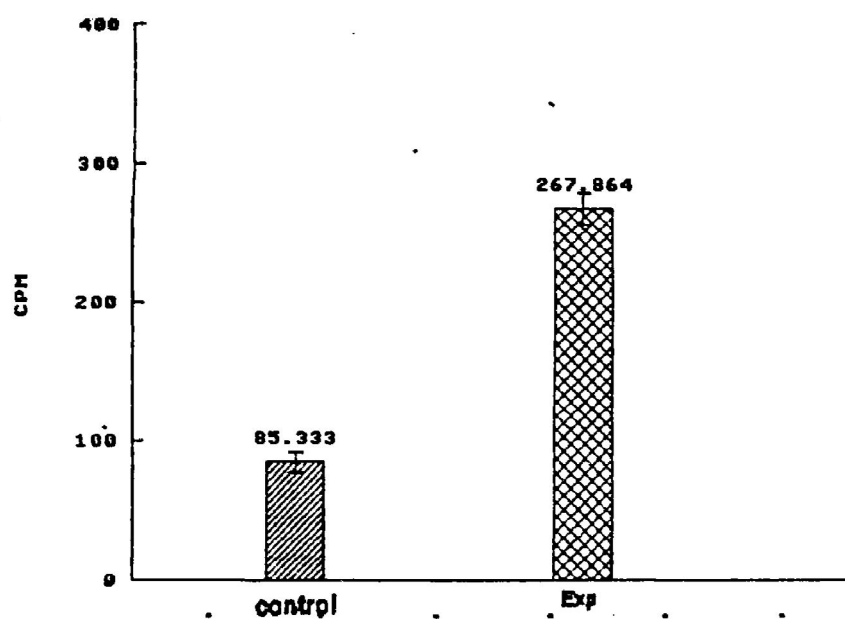


Fig 1 Effect of SMCs—CM on DNA synthesis of NIH 3T3 with tritiated thymidine incorporation

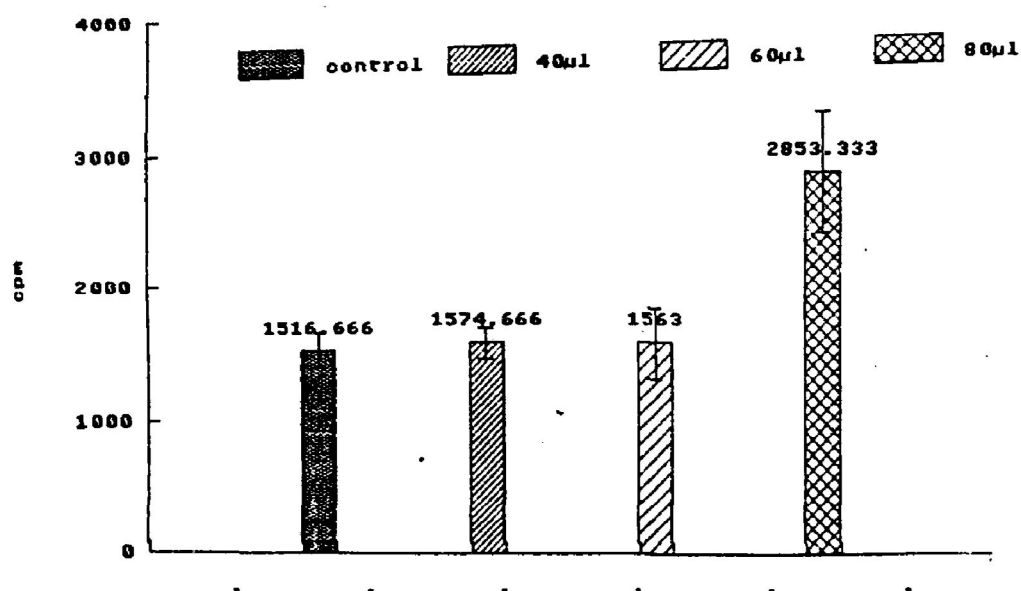


Fig 2 Effect of SMCs—son on DNA synthesis of NIH 3T3 with tritiated thymidine incorporation

Effects of Smooth Muscle Cell—derived Growth Factors on the DNA Synthesis of NIH 3T3 Fibroblasts

Yang Shilin, Deng Zhongduan, Qu Zhiling
Department of Pathology, Tongji Medical University

Migration of smooth muscle cells (SMCs) into subendothelial space and their proliferation were key events in the atherogenesis, and were influenced by a variety of factors including PDGF, FGF, IGF, EGF, etc. It was known that SMCs could synthesize and secrete growth factors in a paracrine and autocrine manner. The SMCs conditioned medium (SMCs—CM) and the SMCs—sonicate (SMCs—son) were used as the source of growth factors, and their influence on the DNA synthesis of NIH 3T3 fibroblasts by ^3H —Thymidine incorporation. The results showed that SMCs—CM and SMCs—son both promoted the DNA synthesis of NIH 3T3 fibroblasts. These data suggest that growth factors synthesized by SMCs could be partly secreted out cells, among which some could bind with the receptors on SMC membrane, and the rest remained within the cells, stimulating the cells' proliferation.

Key Words: smooth muscle cell; growth factor; atherosclerosis; fibroblast