

• 论著 •

## 碱性成纤维细胞生长因子、新生小牛血清和肝素 对大鼠血管平滑肌细胞迁移的影响

石 纓

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, Newborn Calf Serum and Heparin on Rat Vascular Smooth Muscle Cells Migration *in Vitro*

SHI Ying and WEN Jin-Kun

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

#### ABSTRACT

**Aim** To investigate the effects of basic fibroblast growth factor(bFGF), newborn calf serum(NCS) and heparin on rat vascular smooth muscle cells (VSMC) migration *in vitro*.

**Methods** Cultured rat VSMC were starved for 24 h and then scraped with a single-edged razor blade. Cell migration *in vitro* was assayed by measuring the maximal linear distance of cell nucleus from the cut edge with a calibrated ocular micrometer after cells were incubated with different doses of NCS or bFGF or heparin for 24 h, 48 h, 72 h.

**Results** The migration distances of VSMC stimulated with various concentrations of NCS or bFGF were significantly longer than those of the control group, respectively( $P<0.001$  or  $P<0.01$ ). But the migration distances of VSMC treated by heparin and NCS were shorter than the control(20% of NCS) distances. All the effects were in a dose-dependent fashion.

**Conclusion** NCS and bFGF could stimulate VSMC migration significantly. However, heparin markedly

inhibited VSMC migration induced by NCS.

**KEY WORDS** Vascular smooth muscle cell; Migration; Basic fibroblast growth factor; Heparin; Newborn calf serum

**摘要** 为研究血管平滑肌细胞迁移及其影响因素,建立体外检测血管平滑肌细胞迁移的实验方法,并观察不同浓度的新生小牛血清、碱性成纤维细胞生长因子和肝素作用于血管平滑肌细胞不同时间后对其迁移的影响。结果发现,新生小牛血清和碱性成纤维细胞生长因子均可显著促进血管平滑肌细胞迁移( $P<0.001$ 或 $P<0.01$ );肝素对新生小牛血清诱导的血管平滑肌细胞迁移产生显著抑制作用( $P<0.001$ ),三者的作用强度均与浓度呈正相关。提示碱性成纤维细胞生长因子对血管平滑肌细胞具有促增殖作用,而肝素具有抑制血管平滑肌细胞迁移的作用。

**关键词** 血管平滑肌细胞; 迁移; 碱性成纤维细胞生长因子; 肝素; 新生小牛血清

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖及其从动脉中层向内膜迁移是动脉粥样硬化斑块形成和血管成形术后再狭窄的主要原因。近年来相继发现,多种生长因子和血管活性物质都能显著促进 VSMC 增殖<sup>[1,2]</sup>,但这些物质是否影响 VSMC 迁移目前尚不清楚。本研究建立体外检测 VSMC 迁移的实验方法,观察不同浓度的新生小牛血清(newborn calf serum, NCS)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)及肝素(heparin, HP)对体外培养的 VSMC 迁移的影响,以期寻找抑制 VSMC 迁移的有效途径奠定实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

M199 培养基为 GIBCO 公司产品, NCS 为本室自制, bFGF 购自北京邦定生物医学工程公司,  $^3\text{H}$ -TdR 购自中国科学院原子能研究所, 肝素注射液为上海生物化学制药厂产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 血管平滑肌细胞的培养** 选用 8~10 周龄雄性 SD 大鼠, 取其胸主动脉, 采用贴块法<sup>[3]</sup>, 于 37℃ 5%  $\text{CO}_2$  培养箱内, 用含 10% NCS 的 M199 培养液(青霉素  $10^5$  u/L, 链霉素 100 mg/L)进行原代培养, 待 VSMC 长满培养瓶后, 用胰蛋白酶消化传代, 取第 5~10 代细胞进行实验。

**1.2.2 血管平滑肌细胞迁移距离的测定** 将盖玻片置于培养瓶中, 接种传代培养的 VSMC, 细胞长满后, 以无血清培养液培养 24 h, 取出盖玻片, 参考 Sarkar 等<sup>[4]</sup>的方法, 在显微镜下用无菌刀片将盖玻片上的 VSMC 沿直线刮除一侧, 放回培养瓶中, 同时加入欲观察的影响因素, 继续培养不同时间后, 在显微镜下观察细胞迁移情况, 并按下述方法计算细胞的迁移距离, 即在高倍镜(20×40)下用测微尺测定迁移最近的 VSMC 细胞核至刮线边缘的距离, 观察 10 个视野, 取均值。

**1.2.3 羟基脲对血管平滑肌细胞增殖的影响** 细胞长满后用无血清培养液培养 24 h, 将 VSMC 分为 NCS+羟基脲和 bFGF+羟基脲两个实验组及相应的对照组, 即 NCS 和 bFGF 组, 各组分别给予含 20% NCS 或 40  $\mu\text{g/L}$  bFGF 的培养液, 实验组同时加入羟基脲至终浓度 5 mmol/L, 继续培养 24 h。回收细胞前 6 h, 向培养液中加入  $^3\text{H}$ -TdR 至终浓度 2 mCi/L, 按文献<sup>[5]</sup>方法回收细胞。用  $\beta$  液体闪烁计数器测定 cpm 值, 每组实验重复三次, 取平均值, 按下式计算羟基脲对 VSMC 增殖的抑制率。

$$\text{抑制百分率} = \left(1 - \frac{\text{实验组 cpm 值}}{\text{对照组 cpm 值}}\right) \times 100\%$$

**1.2.4 NCS、bFGF 和肝素对血管平滑肌细胞迁移的影响** 按上述测定 VSMC 迁移距离的实验方法, 观察 VSMC 在含不同浓度 NCS(NCS 组)、bFGF(bFGF 组)和肝素(肝素组)的培养液中培养 24、48 和 72 h 后的迁移距离。

**NCS 组:** M199 培养液中加入 5%、10% 和 20% 的 NCS, 以无血清培养液作对照。

**bFGF 组:** M199 培养液中加入 5、10、20 和 40  $\mu\text{g/L}$  的 bFGF, 以不含 bFGF 的无血清培养液作对照。

**肝素组:** 含 20% NCS 的 M199 培养液中加入  $2.5 \times 10^5$ 、 $5.0 \times 10^5$  和  $1.0 \times 10^6$  u/L 肝素, 以不含肝素的培养液(20% NCS)作对照。

**1.2.5 抑制平滑肌细胞增殖对迁移的影响** VSMC 经无血清培养液培养 24 h 后, 分别换以含 20% NCS、40  $\mu\text{g/L}$  bFGF 和  $5.0 \times 10^5$  u/L 肝素+20% NCS 的培养液作为对照组; 实验组在此基础上再分别给予 5 mmol/L 羟基脲, 于 24、48 和 72 h 检测迁移距离。

### 1.3 统计学处理

所有实验结果均采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 差异的显著性检验采用组间  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 羟基脲对平滑肌细胞增殖的作用

如图 1(Figure 1)所示, 在两个实验组中, VSMC 的  $^3\text{H}$ -TdR 掺入率明显低于相应的对照组, 羟基脲对 bFGF(40  $\mu\text{g/L}$ )和 NCS(20%)促增殖效应的抑制率分别为 89.9% 和 85.3%。

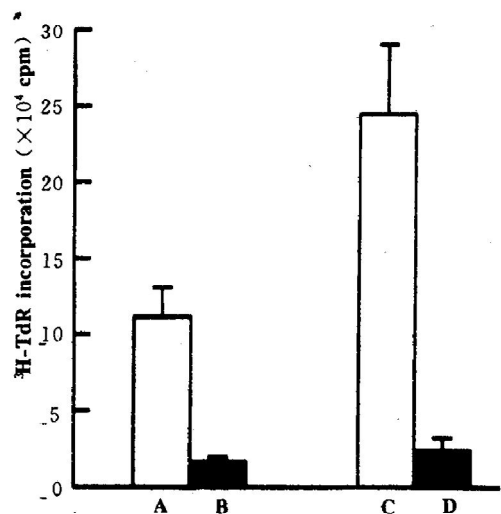


Figure 1. Inhibition effects of hydroxyurea on VSMC proliferation. A: 20% NCS, B: 20% NCS+5 mmol/L hydroxyurea, C: 40  $\mu\text{g/L}$  bFGF, D: 40  $\mu\text{g/L}$  bFGF+5 mmol/L hydroxyurea.

### 2.2 新生小牛血清对平滑肌细胞迁移的影响

从表 1 (Table 1) 可见, NCS 显著促进 VSMC 迁移 ( $P < 0.001$ ), 其促迁移作用随 NCS 浓度增加而增强, 表明 NCS 促迁移作用呈浓度依赖性。

Table 1. Effects of NCS on VSMC migration ( $\mu\text{m}$ ,  $\bar{x} \pm s$ ).

Groups	24 h	48 h	72 h
Control	32.7 $\pm$ 11.5	90.1 $\pm$ 16.6	108.9 $\pm$ 22.9
5% NCS	77.2 $\pm$ 29.2 <sup>a</sup>	144.5 $\pm$ 26.1 <sup>a</sup>	192.1 $\pm$ 41.6 <sup>a</sup>
10% NCS	80.2 $\pm$ 22.8 <sup>a</sup>	187.1 $\pm$ 19.4 <sup>a</sup>	233.6 $\pm$ 41.0 <sup>a</sup>
20% NCS	95.0 $\pm$ 8.8 <sup>a</sup>	222.8 $\pm$ 23.1 <sup>a</sup>	293.0 $\pm$ 32.8 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.001$ , compared with control group.

2.3 碱性成纤维细胞生长因子对平滑肌细胞迁移的影响

图 2(Figure 2)显示,碱性成纤维细胞生长因子能显著刺激 VSMC 迁移,在含各种浓度 bFGF 的培养液中,VSMC 的迁移距离均远远大于不含 bFGF 的无血清培养液(对照组)( $P < 0.001$  或  $P < 0.01$ );且 bFGF 的促迁移作用呈浓度依赖性,在 72 h 时,由低至高各浓度 bFGF 所诱导的 VSMC 迁移距离分别是对照组的 2.3、2.8、3.7 和 4.1 倍。

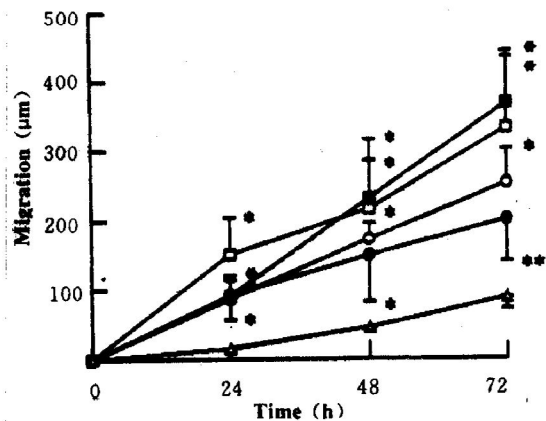


Figure 2. Effects of bFGF on VSMC migration ( $\mu\text{m}$ ,  $\bar{x} \pm s$ ).  $\Delta$ : control,  $\bullet$ : 5  $\mu\text{g/L}$  bFGF,  $\circ$ : 10  $\mu\text{g/L}$  bFGF,  $\square$ : 20  $\mu\text{g/L}$  bFGF,  $\blacksquare$ : 40  $\mu\text{g/L}$  bFGF. \*:  $P < 0.001$ , \*\*:  $P < 0.01$ , compared with control group.

2.4 肝素对平滑肌细胞迁移的影响

从图 3(Figure 3)可见,肝素能明显抑制血管平滑肌细胞的迁移( $P < 0.001$ )。向含 20% NCS 的培养液中加入  $2.5 \times 10^5 \text{ u/L}$ 、 $5.0 \times 10^5 \text{ u/L}$  和  $1.0 \times 10^6 \text{ u/L}$  的肝素,72 h 后,细胞的迁移距离分别是对照组的 36.7%、41.6%和 52.6%。

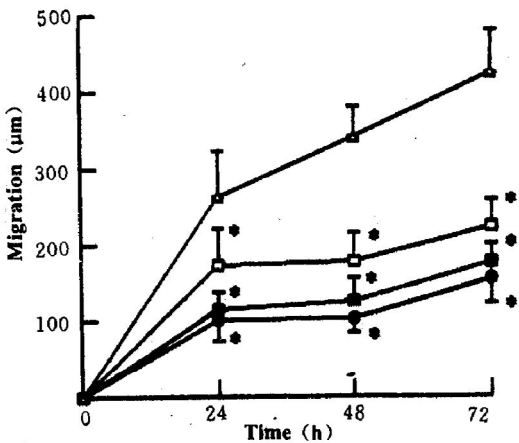


Figure 3. Effects of heparin on VSMC migration ( $\mu\text{m}$ ,  $\bar{x} \pm s$ ).  $\Delta$ : control (20%NCS),  $\square$ :  $2.5 \times 10^5 \text{ u/L}$  heparin,  $\blacksquare$ :  $5.0 \times 10^5 \text{ u/L}$  heparin,  $\bullet$ :  $1.0 \times 10^6 \text{ u/L}$  heparin. \*:  $P < 0.001$ , compared with control group.

2.5 抑制平滑肌细胞增殖对迁移的影响

从表 2(Table 2)可以看出,加入羟基脲的各实验组与相应的对照组(未加羟基脲)相比,各个时间点的迁移距离经统计学检验均无显著差异( $P > 0.05$ ),说明采用羟基脲抑制细胞增殖后,并未明显抑制细胞迁移,即血管平滑肌细胞的迁移并不是由其增殖造成的。

Table 2. Effects of proliferation inhibited by hydroxyurea on VSMC migration ( $\mu\text{m}$ ,  $\bar{x} \pm s$ ).

Groups	24 h	48 h	72 h
NCS	95 $\pm$ 9	223 $\pm$ 23	293 $\pm$ 33
NCS + HD	93 $\pm$ 34	199 $\pm$ 34	264 $\pm$ 13
bFGF	159 $\pm$ 42	253 $\pm$ 61	360 $\pm$ 76
bFGF + HD	157 $\pm$ 41	250 $\pm$ 75	342 $\pm$ 95
HP + NCS	55 $\pm$ 26	140 $\pm$ 33	286 $\pm$ 54
HP+NCS+HD	55 $\pm$ 26	137 $\pm$ 30	260 $\pm$ 39

NCS: 20% NCS, bFGF: 40  $\mu\text{g/L}$  bFGF, HD: hydroxyurea, HP:  $5.0 \times 10^5 \text{ u/L}$  heparin.

3 讨论

目前,各实验室多采用改良 Boyden 小室方法<sup>[6,7]</sup>检测血管平滑肌细胞的迁移及分析不同因素对细胞迁移的影响,该实验方法需要特殊的培养器皿和经胶原处理的滤膜,操作颇为繁杂,我们参照 Sarkar 等<sup>[4]</sup>介绍的方法建立了在盖玻片上检测细胞迁移的分析方法,并通过此

方法检测了新生小牛血清、碱性成纤维细胞生长因子和肝素对大鼠血管平滑肌细胞迁移的影响。为排除细胞增殖对测量细胞迁移距离可能造成的误差,我们采用细胞增殖抑制剂羟基脲来抑制细胞增殖,检查细胞增殖给迁移带来的可能影响,结果显示血管平滑肌细胞的增殖被羟基脲抑制后,其迁移距离并未发生明显改变,从而证实本方法检测细胞迁移的可靠性。

我室以前的研究表明,碱性成纤维细胞生长因子是血管平滑肌细胞的强效有丝分裂原<sup>[1]</sup>,新生小牛血清可显著促进血管平滑肌细胞增殖,肝素对血管平滑肌细胞增殖产生明显抑制作用<sup>[8]</sup>。本研究结果指出,新生小牛血清和碱性成纤维细胞生长因子还可显著促进血管平滑肌细胞迁移,而肝素能显著抑制血管平滑肌细胞迁移,其作用机制目前还不十分清楚,有研究表明血管平滑肌细胞迁移与细胞外基质(Ⅳ型胶原)降解及细胞收缩蛋白基因过度表达有关<sup>[9]</sup>。我们的初步研究揭示,碱性成纤维细胞生长因子和新生小牛血清中的多种生长因子可通过诱导这些基因表达而起到促血管平滑肌细胞迁移的作用。关于肝素抑制血管平滑肌细胞迁移的机理,目前尚所知甚少。本实验不仅证实碱性成纤维细胞生长因子在动脉粥样硬化和血管再狭窄发生发展过程中起着促增殖和促迁移的双重作用,同时也为肝素在临床上用于抗血管平滑肌细胞迁移与增殖提供了新的实验证据。

## 参考文献

- 1 郭庆,温进坤. 碱性纤维母细胞生长因子对血管平滑肌细胞增殖的影响. 中国动脉硬化杂志, 1996, 4(3): 168~171.
- 2 温进坤,贾根深,魏素珍. 内皮素促进细胞增殖相关基因的表达和血管平滑肌细胞增殖. 中国动脉硬化杂志, 1995, 3(1): 5~8.
- 3 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(3): 1113~1117.
- 4 Sarkar R, Meinberg EG, Stanley JC, et al. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1996, 78(2): 225~230.
- 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(4): 211~213.
- 6 王国平,邓仲端,李丽珠,等. 平滑肌细胞源性趋化因子所致单核细胞迁移的钙依赖性研究. 中国动脉硬化杂志, 1994, 2(1): 1~5.
- 7 Koyama N, Harada K, Yamamoto A, et al. Purification and characterization of an autocrine migration factor for vascular smooth muscle cells(SMC), SMC-derived migration factor. *J Biol Chem*, 1993, 268(18): 13301~13308.
- 8 Hoover RL, Rosenberg R, Haering W, et al. Inhibition of rat arterial smooth muscle cell proliferation by heparin. I. In vitro studies. *Circ Res*, 1980, 47(4): 578~583.
- 9 Pauly RR, Passaniti A, Bilato C, et al. Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation. *Circ Res*, 1994, 75(1): 41~54.

(1998-02-28 收稿, 1998-07-10 修回. 编辑: 朱雯霞)