

# 牛主动脉蛋白聚糖对培养的人主动脉平滑肌细胞生长的影响

丛祥凤 刘学文 张英珊

(中国医学科学院心血管病研究所 协和医科大学阜外心血管病医院, 北京100037)

**主题词** 蛋白聚糖; 硫酸肝素; 硫酸软骨素; 硫酸皮肤素; 肌,平滑,血管; 细胞分裂; 生长抑制剂; 主动脉

**摘要** 为探讨蛋白聚糖在动脉粥样硬化发生发展中的作用,观察牛主动脉硫酸肝素蛋白聚糖、硫酸软骨素蛋白聚糖、硫酸皮肤素—硫酸软骨素蛋白聚糖和三种蛋白聚糖的混合物对培养的人主动脉平滑肌细胞增殖的影响。用细胞计数计算硫酸肝素蛋白聚糖(1.5~7.0 mg/L)对培养的人主动脉平滑肌细胞增殖的抑制率分别为0、55%和76%;硫酸软骨素蛋白聚糖(15.0~60.0 mg/L)的抑制率分别为23%、34%和65%;硫酸皮肤素—硫酸软骨素蛋白聚糖(15.0~60.0 mg/L)的抑制率分别为19%、37%和59%;三种蛋白聚糖混合物(10.5~42.0 mg/L)的抑制率分别为33%、55%和65%。用氘标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入法计算硫酸肝素蛋白聚糖(1.5~7.0 mg/L)对培养的人主动脉平滑肌细胞增殖的抑制率分别为0、68%和91%;硫酸软骨素蛋白聚糖(15.0~60.0 mg/L)的抑制率分别为48%、66%和80%;硫酸皮肤素—硫酸软骨素蛋白聚糖(15.0~60.0 mg/L)的抑制率分别为49%、63%和72%;三种蛋白聚糖混合物(10.5~42.0 mg/L)的抑制率分别为65%、79%和91%。结果表明,硫酸乙酰肝素蛋白聚糖、硫酸软骨素蛋白聚糖、硫酸皮肤素—硫酸软骨素蛋白聚糖和三种蛋白聚糖混合物对培养的人主动脉平滑肌细胞增殖均有浓度依赖性的抑制作用。

## Effects of Bovine Aortic Proteoglycans on the Growth of Cultured Human Aortic Smooth Muscle Cells

CONG Xiang-Feng, LIU Xue-Wen and ZHANG Ying-Shan

(Cardiovascular Institute, CAMS and PUMC, Beijing 100037, China)

**MeSH** Proteoglycans; Heparitin Sulfate; Chondroitin Sulfates; Dermatan Sulfate; Muscle, Smooth, Vascular; Cell Division; Growth Inhibitors; Aorta

**ABSTRACT** **Aim** The effect of bovine aortic heparan sulfate proteoglycan (HSPG), chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG), dermatan-chondroitin sulfate proteoglycan (DSCSPG) and mixed PG on the growth of cultured human aortic smooth muscle cells (hASMC) was studied in this article. **Methods** PGs were isolated by dissociative extraction, ion-exchange chromatography and gel filtration from bovine aortic intima-media and their effects on the growth of cultured hASMC were studied by cell count and  $^3\text{H}$ -TdR incorporation. Cultured hASMC were firstly inhibited at G0/G1 by DMEM containing 0.2% human serum (HS) and 0.2% fetal calf serum (FCS), then incubated with DMEM containing 5% HS and 5% FCS and different concentrations of PGs (PGs were presented as hexuronic acid) together with controls of DMEM without PG for 48 h. **Results** The inhibiting percentages of proliferation (based on cell count or  $^3\text{H}$ -TdR incorporation) of hASMC with HSPG (1.5~7.0 mg/L) were 0, 55% and 76% (0, 68% and 91%); with CSPG (15.0~60.0 mg/L) were 23%, 34% and 65% (48%, 66% and 80%); with DSCSPG (15.0~60.0 mg/L) were 19%, 37% and 59% (49%, 63% and 72%) and with mixed PGs (10.7~42.6 mg/L) were 33%, 55% and 65% (65%, 79% and 91%), respectively. **Conclusion** The that bovine aortic HSPG, CSPG, DSCSPG could inhibit the proliferation of hASMC and the inhibiting rate(%) were associated with the PG concentrations.

硫酸肝素蛋白聚糖(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)、硫酸软骨素蛋白聚糖(chondroitin sulfate proteoglycan, CSPG)及硫酸皮肤素—硫酸软骨素蛋白聚糖(dermatan-chondroitin sulfate proteoglycan, DSCSPG)都是动脉壁细胞间质的主要成分,在维持血管壁结构的完整性、粘弹性及通透性

等方面具有重要的生物学作用。近年研究发现,蛋白聚糖(proteoglycans, PG)不仅是细胞间的连结物质,而且参与调节某些生长因子或细胞因子与其受体的结合,在控制血管细胞的粘附、迁移及增殖等方面均有生物学活性<sup>[1,2]</sup>。这些认识主要来自于对肝素及 HSPG 的研究<sup>[3,4]</sup>。动脉壁平滑肌细胞(smooth

muscle cell, SMC)增殖是导致动脉粥样硬化斑块形成和发展以及血管重建后再狭窄的重要因素之一。我们曾报道过人主动脉 HSPG 能抑制培养的人主动脉 SMC (human aortic SMC, hASMC)增殖,但 CSPG 和 DSCSPG 对培养 SMC 的影响尚缺乏认识。为此,本研究探索牛主动脉 CSPG、DSCSPG 及三种 PG 混合物对培养的 hASMC 增殖的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与材料

牛主动脉(北京屠宰厂屠宰后约2 h 取出),胰蛋白酶(Difco),DMEM 培养粉(Gibco),胎牛血清(Gibco),混合人血清(天津血液学研究所),氚标胸腺嘧啶脱氧核苷( $^3\text{H}$ -TdR,中国科学院原子能研究所),其它均为北京化工厂 AR 级。

### 1.2 人主动脉平滑肌细胞的培养

参照文献[4],无菌取出胎儿(约5个月)胸主动脉中膜,以含10%人血清(human serum, HS),10%胎牛血清(fetal calf serum, FCS)的DMEM 培养液贴块培养(5%  $\text{CO}_2$ , 95%空气, 37℃)。

### 1.3 含蛋白聚糖培养液的制备

将冷冻(-30℃)牛主动脉内中膜迅速解冻,提取并分离 PG<sup>[5]</sup>。分离的 HSPG、CSPG 及 DSCSPG 样品对蒸馏水透析(透析袋 MWCO 3500, Spectrum),最后以双蒸水透析至透析外液电导与双蒸水接近为止。将定量 DMEM 培养粉分别加入到含 HSPG、CSPG 和 DSCSPG 的水溶液内,以0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤,4℃储存备用。

### 1.4 醛测定

按照改良的 Bitter 氏法<sup>[6]</sup>,以 D-葡萄糖醛酸内酯为标准,测定 PG 内的醛含量。PG 含量均以 mg 醛表示。

### 1.5 蛋白聚糖对培养的人主动脉平滑肌细胞生长的作用

将培养融合的第三代 hASMC<sup>[4]</sup>用含0.125%胰蛋白酶、0.02% EDTA  $\text{Na}_2$ 的 PBS 液消化传代,接种于24孔板。每孔1 mL(约 $9 \times 10^3$ 细胞),用含5%人血清(HS),5%胎牛血清(fetal calf serum, FCS)的 DMEM 液(5%  $\text{CO}_2$ , 95%空气, 37℃)培养48 h,然后换含0.2% HS, 0.2% FCS 的 DMEM 液培养48 h(将培养的 hASMC 抑制在 G0/G1期)。

### 1.6 实验分组

实验共分五大组15小组;第一大组为含不同浓度 HSPG(7.0、3.5及1.5 mg/L)的5% HS 和5% FCS DMEM 培养液;第二大组为含不同浓度 CSPG

(60.0、30.0及15.0 mg/L)的培养液;第三大组为含不同浓度 DSCSPG(60.0、30.0及15.0 mg/L)的培养液;第四大组为三种 PG 混合的培养液[a 液含 HSPG 2.6 mg/L、CSPG 20.0 mg/L 和 DSCSPG 20.0 mg/L, b 液含 HSPG 1.3 mg/L、CSPG 10.0 mg/L 和 DSCSPG 10.0 mg/L, c 液含 HSPG 0.7 mg/L、CSPG 5.0 mg/L 和 DSCSPG 5.0 mg/L];第五大组为对照组,除不含 PG 外,其它同各实验组。实验组及对照组 hASMC 继续培养48 h,然后用细胞计数(每种 PG 浓度均种3孔)、 $^3\text{H}$ -TdR 掺入法(每种 PG 浓度均种5孔)观察各种 PG 对培养的 hASMC 生长的影响。

### 1.7 数据的统计处理

培养液中净生长细胞数及 hASMC 生长的百分抑制率按下式计算:

净生长细胞数 = 实验至某天的细胞数 - G0/G1期的细胞数

百分抑制率 =  $(1 - \text{实验组净生长细胞数} / \text{对照组净生长细胞数}) \times 100\%$

## 2 结果

### 2.1 硫酸肝素蛋白聚糖对培养的人主动脉平滑肌细胞生长的影响

硫酸肝素蛋白聚糖(HSPG)对培养的 hASMC 生长有抑制作用。当浓度为3.5和7.0 mg/L 时,用细胞计数计算的抑制率分别为55%和76%;用氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入法计算的抑制率分别为68%和91%;但是在较低浓度 HSPG(1.5 mg/L)未见影响(图1, Figure 1)。

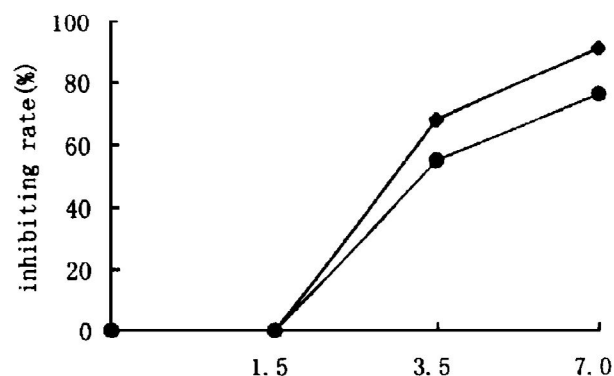


图1. 三种浓度的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖对培养的人主动脉平滑肌细胞生长的影响

Figure 1. Inhibiting rate of hASMC cultured in DMEM containing HSPG at different concentrations. —▲—:  $^3\text{H}$ -TdR; —●—: Cell count; the same below.

### 2.2 硫酸软骨素蛋白聚糖对培养的人主动脉平滑

### 肌细胞生长的影响

三种浓度的 CSPG 对培养的 hASMC 生长均有抑制作用,用细胞计数计算抑制率分别为23%、34%和65%;用氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入法计算的抑制率分别为48%、66%和80%;其抑制率有浓度依赖性(图2, Figure 2)。

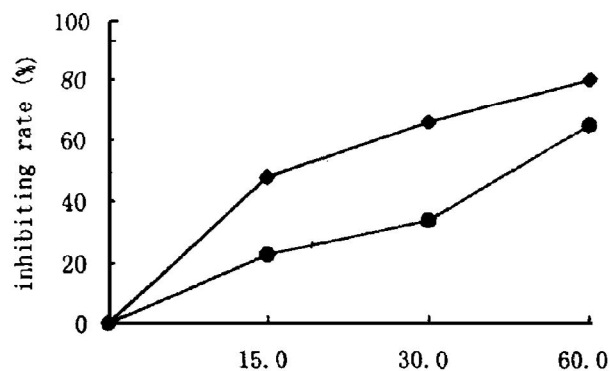


图2. 三种浓度的硫酸软骨素蛋白聚糖对培养的人主动脉平滑肌细胞生长的影响

Figure 2. Inhibiting rate of hASMC cultured in DMEM containing CSPG at different concentrations

### 2.3 硫酸皮肤素—硫酸软骨素蛋白聚糖对培养的人主动脉平滑肌细胞生长的影响

三种浓度的 DSCSPG 对培养的 hASMC 生长均有抑制作用,用细胞计数计算的抑制率分别为19%、37%和59%;用氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入法计算的抑制率分别为49%、63%和72%;其抑制率有浓度依赖性(图3, Figure 3)。

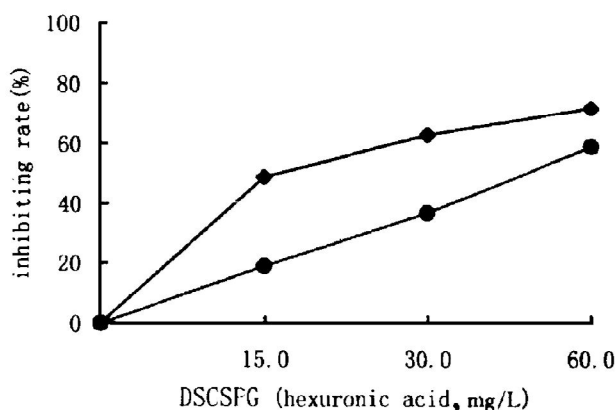


图3. 三种浓度的硫酸皮肤素—硫酸软骨素蛋白聚糖对培养的人主动脉平滑肌细胞生长的影响

Figure 3. Inhibiting rate of hASMC cultured in DMEM containing DSCSPG at different concentrations

### 2.4 不同浓度的三种蛋白聚糖混合物对培养的人主动脉平滑肌细胞生长的影响

不同浓度的三种 PG 混合物对培养的 hASMC

生长均有抑制作用,用细胞计数计算三种不同浓度的蛋白聚糖混合物的抑制率分别为33%、55%和65%;用氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入法计算的抑制率分别为65%、79%和91%。其抑制率随浓度增加而增加(图4, Figure 4)。

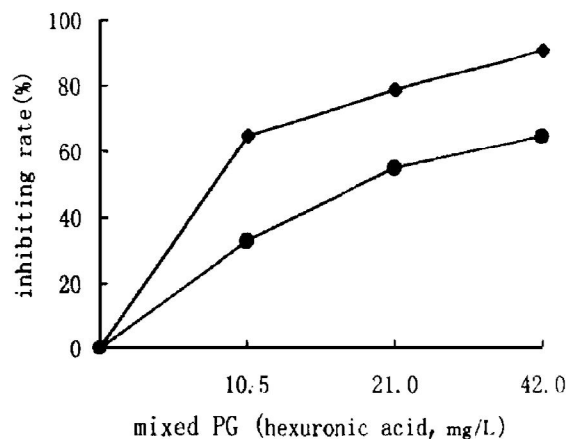


图4. 不同浓度的三种蛋白聚糖混合物对培养的人主动脉平滑肌细胞生长的影响

Figure 4. Inhibiting rate of hASMC cultured in DMEM containing mixed PG at different concentrations

### 3 讨论

本结果显示牛主动脉的硫酸肝素蛋白聚糖、硫酸软骨素蛋白聚糖及硫酸皮肤素—硫酸软骨素蛋白聚糖对培养的人主动脉平滑肌细胞均有抑制作用。用细胞计数法计算出的抑制率均低于<sup>3</sup>H-TdR 掺入法的结果,可能由于<sup>3</sup>H-TdR 掺入法比细胞计数法敏感。国外报道肝素和硫酸乙酰肝素(HS)能抑制培养实验动物的 SMC 增殖。但也有研究者发现牛主动脉的肝素对培养大鼠的 SMC 无抑制作用<sup>[3]</sup>。我们曾发现牛主动脉 HSPG 对培养的大鼠 SMC 生长也有抑制作用(未发表资料)。在体内,肝素是以共价键与核心蛋白相连成 HSPG 的形式存在,因此研究 PG 大分子对 SMC 的作用更切合实际。

近年研究发现硫酸软骨素蛋白聚糖和硫酸皮肤素—硫酸软骨素蛋白聚糖是转移生长因子-β(TGF-β)的低亲和受体,它们通过核心蛋白与转移生长因子-β结合<sup>[7]</sup>。因此这两种 PG 可能也具有生物学活性。CSPG 及 DSCSPG 对培养 SMC 的影响国内外尚未见报道。Castellot 等<sup>[3]</sup>用细胞计数法,加入糖胺聚糖浓度为100 mg/L,发现牛主动脉硫酸软骨素(CSPG 分子中的糖胺聚糖)、硫酸皮肤素(DSPG 分子中的糖胺聚糖)对培养大鼠主动脉的 SMC 抑制率约15%。硫酸软骨素及硫酸皮肤素对培养大鼠的 SMC 的抑制作用较低,是否因其不含核心蛋白或不

同种属所致,有待探讨。

本研究首次报道了混合的三种 PG 对培养的人主动脉平滑肌细胞生长的抑制作用。可能三种 PG 对培养的 hASMC 增殖调节机制各异而互不影响。其确切的机制有待研究。蛋白聚糖参与调节生长因子及细胞因子的活性,对控制血管细胞增殖有非常重要的作用。因此深入研究 PG 与血管细胞增殖的关系及其机制可能对揭示动脉粥样硬化的发生及发展有重要的意义。

#### 参考文献

- 1 Rapraeger AC, Jirufila A, Olwin BB. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science*, 1991, **252**: 1 705—708
- 2 Turnbull JE, Gallagher JT. Heparan sulphate functional role as a modulator of fibroblast growth factor. *Biochem Soc Trans*, 1993, **21**: 477—482
- 3 Castellot JJ, Addonizio ML, Roseberg RD, et al. Cultured endothelial cells produce a heparin like inhibitor of smooth muscle cell growth. *J Cell Biol*, 1981, **90**: 372—379
- 4 张春玲, 丛祥凤, 张英珊, 等. 人主动脉壁硫酸乙酰肝素蛋白聚糖对培养的人主动脉平滑肌细胞生长的影响. *生物化学杂志*, 1996, **12**: 191—195
- 5 张英珊, 丛祥凤, 朱志敏, 等. 人主动脉中的蛋白聚糖. I. 提取、分离及初步鉴定. *生物化学与生物物理学报*, 1987, **19**: 253—259
- 6 Bitter T, Muir HM. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem*, 1962, **4**: 330—334
- 7 Lopez CF, Cheifet S, Doody J, et al. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of TGF-beta receptor system. *Cell*, 1991, **67**: 785—795

(此文1998—09—14收到, 1999—02—06修回)

(此文编辑 胡必利)