

牛主动脉蛋白聚糖对培养的人脐静脉内皮细胞生长的影响

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 为观察牛主动脉中蛋白聚糖对培养的人脐静脉内皮细胞生长的影响及其在动脉粥样硬化形成中的作用, 用解聚提取、离子交换及凝胶过滤柱层析法从牛主动脉内、中膜分离出硫酸乙酰肝素蛋白聚糖、硫酸软骨素蛋白聚糖和硫酸皮肤素-硫酸软骨素蛋白聚糖。用氘标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入法和细胞计数法观察上述三种蛋白聚糖对培养的第一代人脐静脉内皮细胞生长的影响。结果发现, 用氘标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入法计算硫酸乙酰肝素蛋白聚糖的抑制率 (醛酸含量 2.1 ~ 8.3 mg/L) 分别为 28.3%、52.3% 和 75.4%, 硫酸软骨素蛋白聚糖的抑制率 (醛酸含量 9.5 ~ 37.8 mg/L) 分别为 61%、83% 和 91%, 硫酸皮肤素-硫酸软骨素蛋白聚糖的抑制率 (醛酸含量 9.3 ~ 36.9 mg/L) 分别为 58.4%、82.4% 和 86%。用细胞计数法计算硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (醛酸含量 2.1 ~ 8.3 mg/L) 的抑制率分别为 21.5%、37.8%、62.9%, 硫酸软骨素蛋白聚糖 (醛酸含量 9.5 ~ 37.8 mg/L) 的抑制率分别为 37.2%、68.9% 和 76.5%, 硫酸皮肤素-硫酸软骨素蛋白聚糖 (醛酸含量 9.3 ~ 36.9 mg/L) 的抑制率分别为 44.5%、61.6% 和 71.7%。结果提示, 三种蛋白聚糖对培养的人脐静脉内皮细胞有明显的抑制作用, 呈浓度依赖性。

Effect of Bovine Aortic Proteoglycans on the Growth of Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells

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

Cardiovascular Institute and Fu Wai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100037, China

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

ABSTRACT **Aim** To investigate the effect of bovine aortic heparan sulfate proteoglycan (HSPG), chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG) and dermatan-chondroitin sulfate proteoglycan (DSCSPG) on the growth of cultured human umbilical vein endothelial cells (hUVEC).

Methods PGs were isolated by dissociative extraction and column chromatography from bovine aortic intima-media and their effects on the growth of cultured first-passaged hUVEC was studied by ^3H -TdR incorporation and cell count. The first passaged hUVEC (2.5×10^4) were planted onto 24 well plant (5 wells or 3 wells for each PG) and cultured by M_{199} containing 15% HS and 10% FCS for 24 h, and then the hUVEC were incubated with M_{199} containing 15% HS, 10% FCS and different concentrations of PGs (PGs were presented as hexuronic acid) respectively together with controls without PG for 24 h.

Results The inhibiting percentages of proliferation (based on ^3H -TdR incorporation and cell count) with HSPG (hexuronic acid 2.1 ~ 8.3 mg/L) were 28.3%、52.3% and 75.4% (21.5%、37.8% and 62.9%), with CSPG (hexuronic acid 9.5 ~ 37.8 mg/L) were 61%、83% and 91% (37.2%、68.9% and 76.5%) and with DSCSPG (hexuronic acid 9.3 ~ 36.9 mg/L) were 58.4%、82.4% and 86% (44.5%、61.6% and 71.7%).

Conclusion bovine aortic HSPG, CSPG and DSCSPG could inhibit the proliferation of hUVEC and the inhibitions were associated with the PG concentrations.

蛋白聚糖 (proteoglycan, PG) 是糖胺聚糖 (glycosaminoglycan, GAG) 链以共价键与核心蛋白结合形成的生物大分子。PG 是血管壁细胞外基质的重要组成部分, 在维持血管的粘弹性、完整性及通透性等方面具有重要的作用。近年研究发现 PG 不仅是细胞间的连结物质, 而且参与调节某些生长因子、细胞因子与其受体的结合, 对控制血管细胞的粘附、迁移及增殖等均有重要的生物学作用 [1,2]。

内皮细胞 (endothelial cell, EC) 和平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 是构成血管壁两种主要细胞, EC 损伤及 SMC 增殖是导致动脉粥样硬化

(atherosclerosis, As) 发生、发展以及血管重建后再狭窄的重要因素 [3]。我们研究发现牛主动脉硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (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) 对培养的人主动脉 SMC 均有抑制作用 (待发表)。本文首次报道牛主动脉 HSPG、CSPG 及 DSCSPG 均能抑制培养的人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, hUVEC) 增殖。

1 材料和方法

1.1 试剂与材料

牛主动脉 北京屠宰厂屠宰后剥离内膜和中膜, -30℃保存), 胰蛋白酶 (Difco), M₁₉₉培养粉和胎牛血清 (Gibco), 混合人血清 (天津血研所), ³H-TdR (中科院原子能所), 其它均为北京化工厂 AR 级。

1.2 含蛋白聚糖培养基的制备

将牛主动脉内、中膜迅速解冻, 提取并分离 PG^[4]。分离的 HSPG、CSPG 及 DSCSPG 样品用蒸馏水透析 (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 M₁₉₉培养粉分别加入到含 HSPG、CSPG 及 DSCSPG 的水溶液内, 以 0.45 μm 滤膜过滤, 4℃储存备用。

1.3 人脐静脉内皮细胞的培养

新生儿脐带 4 根 (产后 48 h 内), 注入 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 冲洗脐静脉管腔。注入 0.25% 胰蛋白酶, 37℃水浴消化 12~15 min, 离心 5 min (1 000 r/min), 弃上清, 加入含 15% 人血清, 10% 胎牛血清的 M₁₉₉培养基, 接种于塑料培养瓶 25 cm², 细胞数约 8×10⁵, 95% 空气, 5% CO₂, 37℃) 培养, 隔 2~3 天换液一次。7~8 天汇合。

1.4 蛋白聚糖对培养的人脐静脉内皮细胞生长的作用

将培养的内皮细胞以含 0.125% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA-Na₂ 磷酸盐缓冲液消化传代, 接种于 24 孔培养板。每孔 1 mL (约 2.5×10⁴ 细胞), 用含 15% 人血清和 10% 胎牛血清的培养基 5% CO₂, 95% 空气, 37℃) 培养 24 h, 然后换低浓度血清 (5% 人血清, 5% 胎牛血清) 培养基培养 48 h。实验共分四组: ①不同浓度 HSPG (含醛酸 2.1、4.2 及 8.3 mg/L), 15% 人血清, 10% 胎牛血清 M₁₉₉培养基; ②不同浓度 CSPG (含醛酸 9.5、18.9 及 37.8 mg/L) 培养基; ③不同浓度 DSCSPG (含醛酸 9.3、18.5 及 36.9 mg/L) 培养基; ④对照组, 除不含 PG 外, 其它同各实验组。实验组及对照组 hUVEC 继续培养 24 h, 然后用 ³H-TdR 掺入法 (每种 PG 浓度均种 5 孔) 和细胞计数法 (每种 PG 浓度均种 3 孔) 观察各种 PG 对培养的 hUVEC 生长的影响。

培养的 hUVEC 的抑制率 (%) = (1 - 实验组每分钟计数 / 对照组每分钟计数) × 100%

2 结果

2.1 三种蛋白聚糖对培养的人脐静脉内皮细胞增殖的作用

牛主动脉壁中的 HSPG、CSPG 和 DSCSPG 对培养的第一代 hUVEC 均有抑制作用 (表 1, Table 1)。

表 1. 蛋白聚糖对培养的人脐静脉内皮细胞生长的影响

Table 1. Effect of aortic PGs on hUVEC growth ($\bar{x} \pm s$)

Groups	Content (mg/L)	³ H-TdR incorporation (kCi/min•10 ⁴ cells, n=5)	Cell number (×10 ³ , n=3)
Control	0	23.16 ± 4.80	32.93 ± 1.49
HSPG	2.1	16.60 ± 3.38 ^a	25.85 ± 2.97
	4.2	11.05 ± 1.27	20.48 ± 3.73
	8.3	5.70 ± 1.08	12.22 ± 1.56
CSPG	9.5	9.06 ± 2.28	20.68 ± 1.18
	18.9	3.94 ± 1.03	10.24 ± 1.94
	37.8	2.09 ± 0.37	7.74 ± 1.71
DSPG	9.3	9.65 ± 2.01	18.28 ± 1.56
	18.5	4.08 ± 0.36	12.64 ± 1.60
	36.9	3.25 ± 1.28	9.32 ± 1.13

a: P > 0.05, other groups P < 0.05, compared with control group

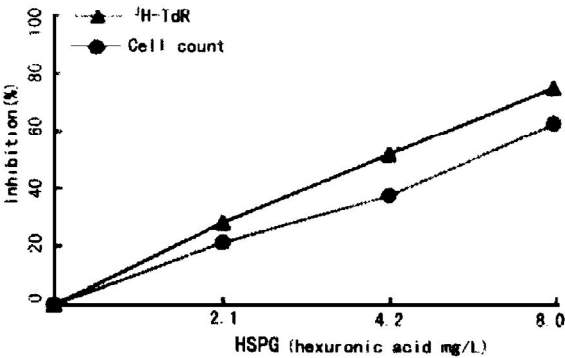


图 1. 不同浓度的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖对培养的人脐静脉内皮细胞生长的抑制率

Figure 1. Inhibition of hUVEC cultured in different concentrations of HSPG

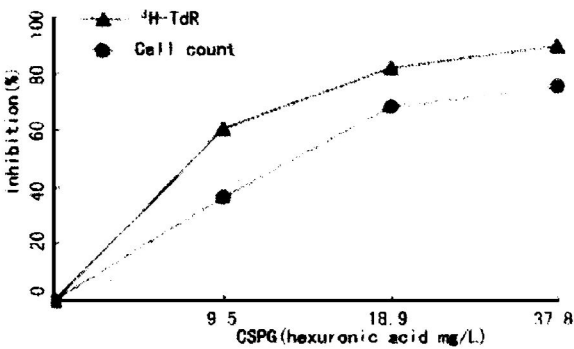


图 2. 不同浓度的硫酸软骨素蛋白聚糖对培养的人脐静脉内皮细胞生长的抑制率

Figure 2. Inhibition of hUVEC cultured in different concentrations of CSPG

2.2 三种蛋白聚糖对培养的人脐静脉内皮细胞生长的抑制率

HSPG 对培养的 hUVEC 的抑制率有浓度依赖性,呈线性关系(图 1, Figure 1)。CSPG、DSCSPG 对培养的 hUVEC 的抑制率与低浓度 PG 呈线性关系,与中、高浓度 PG 略有差异(图 2 和 3, Figure 2 and 3)。

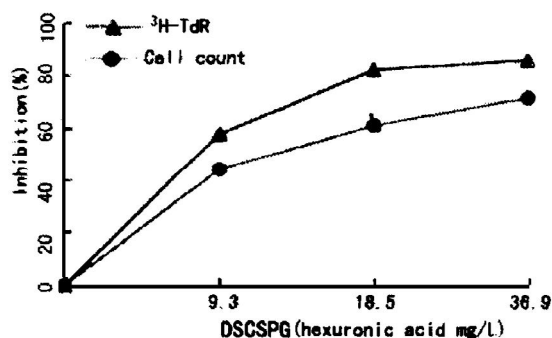


图 3. 不同浓度的硫酸皮肤素-硫酸软骨素蛋白聚糖对培养的人脐静脉内皮细胞生长的抑制率

Figure 3. Inhibition of hUVEC cultured in different concentrations of DSCSPG

3 讨论

动脉壁 EC 和 SMC 均能合成和分泌 HSPG、CSPG 及 DSCSPG。PG 不仅是细胞间的连接物质,而且对血管细胞的粘附、迁移及增殖具有重要的生物学活性。该认识主要来自肝素及硫酸乙酰肝素抑制培养的 SMC 增殖^[6,7]。两者的结构和功能相似,前者主要来自肥大细胞,后者主要位于内皮细胞的表面并以 HSPG 大分子存在^[8]。因此研究 PG 大分子对血管细胞生长的影响更有实际意义。关于血管壁 EC 的研究较少,结果也不一致。Castellot 等^[9]报道肝素促进培养的牛主动脉 EC 增殖,增殖率为 10%~30%。Imamura 等^[10]提出肝素和硫酸乙酰肝素抑制培养的猪血管 EC 增殖。提示肝素和硫酸乙酰肝素对培养的不同种属的 EC 作用不同。我们以往的研究发现,人主动脉 HSPG 对培养的 hUVEC 有促增殖的作用^[11],但本结果则发现牛主动脉 HSPG 抑制培养的 hUVEC 增殖,可能因两种不同来源的 HSPG 带电差异所致。牛主动脉 HSPG 被在 0.24~0.30 mol/L NaCl 洗脱,而人主动脉 HSPG 被在 0.23~0.26 mol/L NaCl 洗脱,提示二者的硫酸化程度不同。因 PG 分子硫酸化的位置和程度与细胞增殖密切相关^[11]。

近年研究发现 CSPG 和 DSCSPG 是 β -转移生长因子 β -transforming growth factors, β -TGF 的低亲和受体^[12],它们通过核心蛋白与 β -TGF 结合。因此这两

种 PG 也具有生物学活性。CSPG 及 DSCSPG 对培养的 EC 的影响国内外尚未见报道。本研究首次发现牛主动脉 CSPG 和 DSCSPG 对培养的第一代 hUVEC 有抑制作用。两者的抑制曲线基本相似,可能因为两种 PG 的糖链分子有一定的相似性,如含有硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS),且硫酸皮肤素 (dermatan sulfate, DS)是 CS 的异构体。PG 是多种生长因子及细胞因子的受体及亚受体,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 As 的发生及发展有重要的理论和实际意义。

参考文献

- 1 Rapraeger AC, Jirufia A, Olwin BB. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science*, 1991, **252**: 1705-1708
- 2 Turnbull JE, Gallagher JT. Heparan sulphate functional role as a modulator of fibroblast growth factor. *Biochem Soc Trans*, 1993, **21**: 477-482
- 3 Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, et al. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis prone regions. *Circulation*, 1992, **85**: 391-405
- 4 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
- 5 杨小平,陈国芬,张英珊. 人脐静脉内皮细胞的培养. *中国心血管病杂志*, 1988, **16**: 298-300
- 6 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
- 7 Nugent MA, Karnovsky MJ, Edelman ER. Vascular cell-derived HSPG coupled inhibition of bFGF binding and mitogenesis in vascular smooth muscle cells. *Cir Res*, 1993, **73**: 1051-1061
- 8 Turnbull JE, Callagher JE. Specific heparan sulphate saccharides mediate the activity of basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 931-935
- 9 Imamura T, Mitsui Y. Heparan sulfate and heparin as a potentiator or suppressor of growth of normal and transformed vascular endothelial cells. *Exp Cell Res*, 1987, **172**: 92-100
- 10 丛祥凤,张春玲,张英珊. 人主动脉硫酸乙酰肝素蛋白聚糖对培养的人脐静脉内皮细胞生长的影响. *生物化学杂志*, 1996, **12**: 599-602
- 11 Gallagher JT. Structure-activity relationship of heparan sulphate. *Biochemical Society Transactions*, 1997, **25**: 1206-1209
- 12 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 1998-11-01 收到, 1999-04-26 修回)

此文编辑 文玉珊)