

[文章编号] 1007- 3949(2000) - 01- 0017- 04

•实验研究•

家兔主动脉平滑肌细胞条件培养基抑制血管平滑肌细胞增殖

徐仓宝, 张亚萍, 王亚文

(西安医科大学动脉粥样硬化研究室, 陕西省西安市 710061)

[关键词] 肌, 平滑, 血管; 条件培养基; 增殖; 自分泌; 旁分泌; 生长抑制因子; 动脉粥样硬化

[摘要] 为探讨血管平滑肌细胞自分泌和旁分泌对血管平滑肌细胞增殖的抑制作用, 采用家兔主动脉贴块培养法培养血管平滑肌细胞, 并制备平滑肌细胞条件培养基。采用孔径 100 kDa 和 10 kDa 的 Millipore 滤膜, 将平滑肌细胞条件培养基分部。平滑肌细胞增殖测定采用宝灵曼试剂盒 XTT 法。结果提示, 家兔血管平滑肌细胞条件培养基抑制血管平滑肌细胞的增殖, 浓度 50% 的平滑肌细胞条件培养基抑制血管平滑肌细胞的增殖率高达 45%, 且该生长抑制活性物质具有剂量依赖、加热 56℃ 30 min 稳定和分子质量小于 10 kDa 的特点。

[中图分类号] R364.3

[文献标识码] A

The Conditioned Medium from Rabbit Aortic Smooth Muscle Cells Inhibited Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cell

XU Cang- Bao, ZHANG Ya- Ping, and WANG Ya- Wen

(Laboratory for Atherosclerosis Research, Xi'an Medical University, Xi'an 710061, China)

MeSH Muscle, Smooth, Vascular; Conditioned Medium; Proliferation; Autocrine; Paracrine; Growth Inhibitor; Atherosclerosis

ABSTRACT **Aim** To ascertain whether vascular smooth muscle cells inhibit vascular smooth muscle cell proliferation by autocrine or paracrine of growth inhibitors. **Methods** Conditioned medium from rabbit aortic smooth muscle cell was used in this study. The conditioned medium was filtered by cut off M. W. 100 kDa or 10 kDa (Millipore). Smooth muscle cell proliferation was assayed by the measurement of XTT (Boehringer Mannheim). **Results** Rabbit aortic smooth muscle cell conditioned medium inhibited smooth muscle cell proliferation, 50% smooth muscle cell conditioned medium achieved 45% inhibitory rate of smooth muscle cell proliferation. This inhibition activity substance is dose dependent, 56℃, 30 min heat stable and M. W. less than 10 kDa. **Conclusions** Rabbit aortic smooth muscle cell could inhibit smooth muscle cell proliferation by autocrine or paracrine growth inhibitors.

动脉平滑肌细胞增殖在动脉粥样硬化发生和发展中起重要作用^[1]。当动脉局部受损或在生长因子刺激下, 动脉平滑肌细胞从中层移行到内膜下, 并在内膜下增殖, 参与损伤的修复过程。大量研究资料表明, 动脉平滑肌细胞能够分泌血小板源生长因子 (platelet- derived growth factor, PDGF)、纤维母细胞生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 以及转化生长因子-β (transforming growth factor-β, TGF-β) 等, 并

通过自分泌或旁分泌的方式调节平滑肌细胞自身的增殖^[2]。但是, 动脉平滑肌细胞分泌生长抑制因子, 参与平滑肌细胞增殖调控的研究报道甚少。我们既往的研究证明, 动脉内皮细胞分泌生长刺激活性物质和生长抑制活性物质, 二者的平衡调节平滑肌细胞的增殖^[3-5]。本研究采用家兔主动脉平滑肌细胞条件培养基, 观察其对动脉平滑肌细胞增殖的影响作用, 旨在探讨动脉平滑肌细胞通过自分泌或旁分泌或旁分泌生长抑制活性物质调节平滑肌细胞增殖的作用。

[基金项目] 国家自然科学基金资助课题(项目编号 39570318)

[作者简介] 徐仓宝, 男, 1957 年 3 月出生, 研究员, 博士研究生导师, 西安医科大学首批跨世纪学术带头人, 西安医科大学动脉粥样硬化研究室暨分子生物学技术培训中心主任, 卫生部微量元素与地方病重点实验室学术委员会主任, 陕西省生理学会副理事长。从事血管细胞生物学及动脉粥样硬化发病机制的研究工作, 发表有关研究论文 50 多篇。曾获国家、省(部)级科学基金资助课题 10 余项。指导研究生 10 多名。荣获兰州军区科学技术进步三等奖。

1 材料与方法

1.1 家兔主动脉平滑肌细胞的培养和鉴定

家兔 12 周左右, 耳缘静脉注气处死, 取主动脉纵向剖开, 去除动脉外膜和内皮, 然后将动脉中层平

滑肌切成表面积为 $1 \times 1 \text{ mm}^2$ 的小块, 种植在底表面积为 12.5 cm^2 的玻璃培养瓶中, 用含 15% 新生小牛血清(new born bovine serum, NBS) 的 DMEM/F12 (Sigma) 1:1 培养基, 在 37°C , 5% CO_2 条件下进行培养, 0.25% 胰酶消化传代, 5~10 代平滑肌细胞用于实验^[6]。平滑肌细胞台盼蓝染色, 活细胞数在 98% 以上。平滑肌细胞的鉴定采用 α -actin 免疫组织学组织化学染色阳性, 以及形态学典型的“峰和谷”样生长状态判定。

1.2 条件培养基的制备

传代后的平滑肌细胞在底面积为 25 cm^2 玻璃培养瓶中生长融合后, 再继续培养 3 天, 用 PBS (pH 7.4) 洗 3 次, 换成无血清培养基 5 mL, 48 h 后收集条件培养基, 离心 10 min, 去除细胞碎片, -20°C 保存。实验时分别在 24 h, 48 h 及 72 h 收集条件培养基^[4]。

1.3 条件培养基的过滤分离

采用 Millipore 滤膜, 孔径 100 kDa 或 10 kDa, 将平滑肌细胞条件培养基粗分为分子质量小于 100 kDa 或小于 10 kDa 两部分^[7]。

1.4 平滑肌细胞增殖测定

采用 XTT 法 (Boehringer Mannheim)^[8]。简而言之, 培养细胞在 24 孔板中, PBS 洗三次, 加入 XTT 检测液 (XTT/PBS 1:2) 0.5 mL, 在 37°C , 5% CO_2 条件下培养 12 h, 收集 XTT 检测液, 紫外分光光度计 (PE, Lambda 5) 492 nm 处读数。

1.5 实验步骤

平滑肌细胞按每孔 6 000 个细胞种植在 24 孔培养板(NUNC) 中, 用 15% NBS 的 DMEM/F12 培养基, 在 37°C , 5% CO_2 条件下培养 24 h, 用 PBS 洗三次, 换成 0.25 mL 无血清培养基加 0.25 mL 无血清条件培养基。对照组为 0.5 mL 无血清培养基。然后在 37°C , 5% CO_2 条件下培养 48 h, 进行 XTT 检测。条件培养基不同作用时间试验分别在 24 h, 48 h 和 72 h 进行 XTT 检测。平滑肌细胞增殖抑制率按以下公式计算:

增殖抑制率(%) = $[1 - \frac{\text{实验组 XTT OD}(\bar{x}) \text{ 值}}{\text{对照组 XTT OD 值}(\bar{x})}] \times 100\%$

1.6 条件培养基热稳定实验

将条件培养基加热至 56°C 30 min, 待冷却后, 按 1:1 比例与无血清培养基进行混合, 然后用于实验。

1.7 统计学处理

所有数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示。统计学采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 家兔主动脉平滑肌细胞条件培养基对平滑肌细胞的增殖抑制作用

无血清平滑肌细胞条件培养基与无血清培养基按 1:3、1:1 和 3:1 混合, 得到 25%、50% 和 75% 的平滑肌细胞条件培养基。把不同浓度的条件培养基加入 24 孔板平滑肌细胞培养中, 每孔 1 mL, 培养 48 h, 用 XTT 法测定细胞增殖, 计算平滑肌细胞增殖抑制百分率, 结果如表 1 (Table 1) 所示。

表 1. 不同浓度家兔主动脉平滑肌细胞条件培养基对平滑肌细胞增殖的抑制作用

Table 1. Effects of different does of conditioned medium from rabbit aortic smooth muscle cells on inhibition of smooth muscle cell proliferation

Groups	n	OD of XTT	Inhibiting rate(%)
Control (SF)	4	1.423 \pm 0.083	0
25% CM	4	1.178 \pm 0.074 ^b	17
50% CM	4	0.780 \pm 0.192 ^c	45
75% CM	4	0.438 \pm 0.025 ^d	69

CM= conditioned medium, SF= Serum free medium. b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$, d: $P < 0.001$, compared with control group.

由表 1 (Table 1) 可以看出, 与无血清培养基相比, 无血清平滑肌细胞条件培养基对平滑肌细胞增殖有显著抑制作用, 且随着浓度增大, 抑制作用增强 ($r = -0.9960$, $P < 0.001$)。

2.2 家兔主动脉平滑肌细胞条件培养基不同收集时间对平滑肌细胞增殖抑制作用的影响

融合三天后的平滑肌细胞, 用 PBS 洗 3 次, 换成无血清培养基, 分别在换液后 24 h、48 h 和 72 h 收集条件培养基, 与无血清培养基按 1:1 混合后, 加入 24 孔板平滑肌细胞培养中, 每孔 1 mL, 培养 48 h, 用 XTT 法测定细胞增殖, 计算平滑肌细胞增殖抑制百分率。结果如表 2 (Table 2) 所示。可见, 平滑肌细胞条件培养基不同收集时间对条件培养基抑制平滑肌增殖作用有一定的影响, 随着收集时间的延长, 生长抑制活性有增强的趋势。

2.3 条件培养基热稳定实验

将条件培养基加热至 56°C 30 min, 冷却后, 与无血清培养基按 1:1 混合, 加入 24 孔板平滑肌细胞培养中, 每孔 1 mL, 培养 48 h, 测 XTT 值, 计算平滑肌细胞增殖抑制百分率。实验结果如图 1 (Figure 1) 所示。

由图 1 (Figure 1) 可以看出, 加热前后, 家兔主动脉平滑肌细胞条件培养基抑制平滑肌细胞增殖的活

性无显著变化 ($P > 0.05$)。

表 2. 家兔主动脉平滑肌细胞条件培养基不同收集时间对平滑肌细胞增殖抑制作用的影响

Table 1. Effects of different collecting time of conditioned medium from rabbit aortic smooth muscle cells on inhibition of smooth muscle cell proliferation

Groups	n	OD of XTT	Inhibiting rate(%)
Control (SF)	4	1.533 ± 0.323	0
24 h	4	1.102 ± 0.235 ^c	28
48 h	4	0.940 ± 0.112 ^c	39
72 h	4	0.842 ± 0.155 ^c	45

CM= conditioned medium, SF= Serum free medium. c: $P < 0.01$, compared with control group.

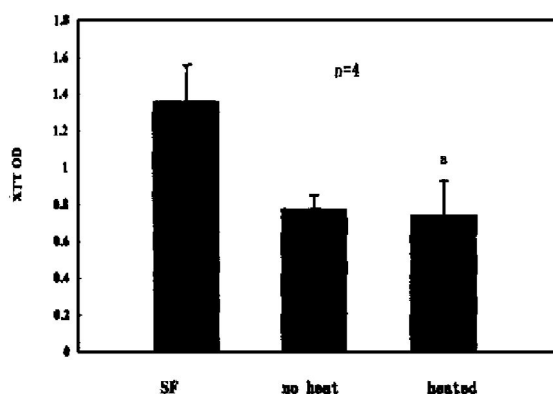


图 1. 家兔主动脉平滑肌细胞条件培养基生长抑制活性的热稳定实验

Figure 1. Effect of heat on growth inhibiting activity of conditioned medium from rabbit aortic smooth muscle cells

SF = serum free medium, no heat = no heat conditioned medium, heated = heated conditioned medium. a: $P > 0.05$, compared with no heat conditioned medium.

2.4 条件培养基分部试验

采用孔径 100 kDa 或 10 kDa Millipore 滤膜, 将条件培养基粗分为分子质量小于 10 kDa 和小于 100 kDa 两个部分, 然后把它们分别与无血清培养基按 1:1 混合, 加入 24 孔板平滑肌细胞培养中, 每孔 1 mL, 培养 48 h, 测 XTT 值, 计算平滑肌细胞增殖抑制百分率。结果如图 2 (Figure 2) 所示。可见, 与家兔主动脉平滑肌细胞条件培养基相比, 分子质量小于 100 kDa 部分和分子质量小于 10 kDa 部分, 三者之间对平滑肌细胞增殖抑制作用没有显著性差异 ($P > 0.05$)。

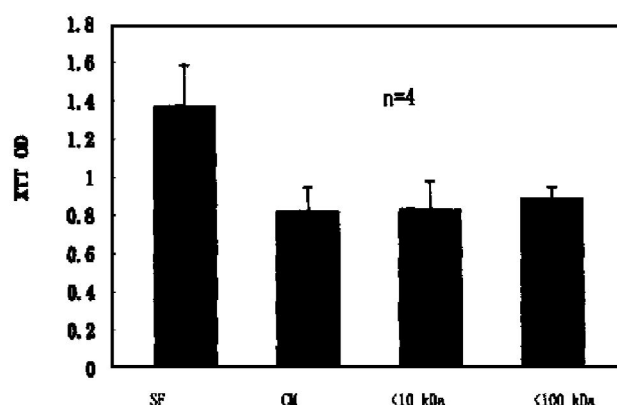


图 2. 不同分部的家兔主动脉平滑肌细胞条件培养基对平滑肌细胞增殖的抑制作用

Figure 2. Effect of different fractions of conditioned medium from rabbit aortic smooth muscle cells on smooth muscle cell proliferation

SF= serum free medium, CM= conditioned medium, < 10 kDa= M. W. less than 10 kDa of conditioned medium, < 100 kDa= M. W less than 100 kDa of conditioned medium, n= number of wells

3 讨论

本文对家兔主动脉平滑肌细胞条件培养基影响平滑肌细胞增殖的作用进行了实验观察, 结果提示: 平滑肌细胞条件培养基可以抑制平滑肌细胞增殖, 且该生长抑制活性物质具有剂量依赖, 热稳定, 分子质量小于 10 kDa 的特点。这与我们以前报道的牛主动脉内皮细胞条件培养基中的小分子生长抑制活性物质相类似^[3,4]。血管细胞条件培养基中存在着许多刺激平滑肌细胞增殖的因子, 如: PDGF, FGF 等, 同时也存在着抑制平滑肌增殖的因子, 如: TGF- β , 肝素样物质。但 TGF- β 和肝素样物质分子质量比 10 kDa 大。平滑肌细胞分泌的一氧化氮 (nitric oxide, NO) 和前列环素 (prostaglandin I_2 , PGI $_2$), 它们虽分子质量小, 且具有抑制平滑肌细胞增殖的作用, 但因其半衰期仅数秒钟到数分钟, 不可能通过条件培养基发挥其抑制细胞增殖的活性^[9]。本研究结果提示家兔平滑肌细胞条件培养基中存在一种小分子生长抑制物质, 但其性质有待于进一步试验澄清。从理论上讲, 条件培养基对细胞增殖起负调节还是正调节作用, 是由条件培养基中生长刺激活性物质和生长抑制活性物质之间的平衡决定。若生长刺激活性物质占优势, 则刺激细胞增殖, 若生长抑制活性物质占

优势,则抑制细胞增殖。在本实验条件下,家兔主动脉平滑肌条件培养基中生长抑制活性可能占优势。因此,条件培养基中的多种生长因子可能不能够发挥生长刺激作用,这与 Orledge 等^[10]和 Dodge 等^[7]人的研究结果有相同之处^[11],同时,也与生理状态下体内血管平滑肌细胞处于静止和非增殖状态相符合。由此推测,在各种动脉粥样硬化的“危险因子”作用下,血管壁局部生长刺激活性和生长抑制活性之间的平衡紊乱,使得生长刺激活性占优势,引起平滑肌细胞大量增殖,从而参与动脉粥样硬化病灶的形成和发展。

参考文献

- [1] Ross R. 90 年代动脉粥样硬化发病机制的研究进展和方向 [J]. 中国动脉硬化杂志, 1993, 1(1): 79-84
- [2] Schwartz SM, DeBlois D, O'Brien ER. The intima Soil for atherosclerosis and restenosis[J]. Circ Res, 1995, 77(3): 445-65
- [3] Xu CB, PessahRH H Stavenow L. Interactions between cultured bovine arterial endothelial and smooth muscle cells: Effects of injury on the release of growth stimulating and growth inhibiting substances [J]. Pharmacol & Toxicol, 1991, 69: 195-200
- [4] Xu CB, Falke P, and Stavenow L. Interactions between cultured bovine arterial smooth muscle cells and endothelial cells: Studies on the release of growth inhibiting and growth stimulating factors [J]. Artery, 1990, 17: 297-310
- [5] Xu CB, Stavenow L, and Pessen- Rasmussen H. Interactions between cultured bovine arterial endothelial and smooth muscle cells; Studies on the release of prostacyclin by endothelial cells [J]. Artery, 1992, 19: 94-111
- [6] Sato Y, Tsuboi et al. Characterization of the activation of latent TGF- β by co-culture of endothelial cells and pericytes or smooth muscle cells: a self-regulating system [J]. J Cell Biol, 1990, 111: 757-763
- [7] Dodge AB, Lu X, D'Amore PA. Density-dependent endothelial cell production of an inhibitor of smooth muscle cell growth [J]. J Cell Biochem, 1993, 53(1): 21-31
- [8] Roehm NW, Rodgers GH, et al. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT [J]. J Immunol Methods, 1991, 142(2): 257-265
- [9] Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system [J]. Cardiovas Res, 1999, 43(3): 509-520
- [10] Orledge A, D'Amore PA. Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells [J]. J Cell Biol, 1987, 105: 757-763
- [11] McMurray HF, Proudfoot D, et al. A small molecular mass inhibitor of growth of 3T3 cells and porcine aortic smooth muscle cells released from the macrophage cell line P388D1 [J]. J Cell Sci, 1993, 106(4): 1301-11

(此文 1999-05-24 收到, 2000-03-07 修回)

(此文编辑 胡必利)

•读者•作者•编者•

中国动脉硬化杂志编辑部 1999 年度特邀审稿人

丁翠芬 衡阳医学院附属第二医院
尹卫东 衡阳医学院心血管病研究所
吴学思 北京安贞医院心内科
王笃圣 天津医科大学卫生学系
沃兴德 浙江中医学院分子医学研究所
李进 第一军医大学组织胚胎学教研室
宋剑南 中国中医研究院基础理论研究所
张祖辉 华西医科大学基础医学院
周新 湖北医科大学医学检验系
洪嘉玲 湖北医科大学生物化学教研室
潘敬运 中山医科大学生理学教研室
韩琴琴 上海医科大学附属中山医院
周少琴 衡阳医学院预防医学系
黎健 北京医院卫生部北京老年医学研究所
栗秀初 第四军医大学西京医院
徐仓宝 西安医科大学病理生理学教研室

吕传真 上海医科大学华山医院
李健斋 北京医院卫生部北京老年医学研究所
陈生第 上海第二医科大学瑞金医院
黄应恒 衡阳医学院附属第二医院
叶平 解放军总医院老年心内科
安靓 第一军医大学组织胚胎学教研室
文格波 衡阳医学院附属第一医院
全智华 衡阳医学院附属第一医院
刘毅 北京医科大学公共卫生学院
陈孝曙 中国预防医学科学院营养与食品卫生所
戴汝平 阜外心血管病医院放射科
陈星荣 上海医大附属华山医院放射科
高中度 上海同仁医院心内科
王文吉 上海医科大学附属眼耳鼻喉医院
匡希斌 衡阳医学院附属第二医院
张道友 皖南医学院弋矶山医院肾内科