

碱性成纤维细胞生长因子和白细胞介素 6 促进大鼠血管平滑肌细胞增殖的协同作用

潘晓宏, 单江, 罗建红¹

(浙江大学医学院附属第二医院心内科, 浙江省杭州市 310009; 1. 医学分子生物学实验室)

[主题词] 成纤维细胞生长因子, 碱性; 白细胞介素 6; 肌, 平滑; 细胞增殖; 协同作用; 动脉粥样硬化

[摘要] 为观察碱性成纤维细胞生长因子和白细胞介素 6 促进血管平滑肌细胞增殖的协同作用, 采用大鼠主动脉贴块法培养血管平滑肌细胞, 用 5- 溴- 2- 脱氧尿嘧啶掺入法和细胞计数法观察碱性成纤维细胞生长因子和白细胞介素 6 对平滑肌细胞增殖的影响。结果发现, 0~ 10.0 $\mu\text{g/L}$ 碱性成纤维细胞生长因子和 0~ 100 $\mu\text{g/L}$ 白细胞介素 6 能促进平滑肌细胞增殖, 且呈剂量依赖性, 1.0 $\mu\text{g/L}$ 碱性成纤维细胞生长因子和 1.0 $\mu\text{g/L}$ 白细胞介素 6 促进细胞增殖, 且 48 h 内呈时效依赖性, 作用高峰在 24 h, 两者合用促进细胞增殖作用大于两者单用作用之和, 呈协同作用。

[中图分类号] R364.3

[文献标识码] A

The Synergistic Effect of Basic Fibroblast Growth Factor and Interleukin- 6 on Rat Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation

PAN Xiao- Hong, SHAN Jiang, and LUO Jian- Hong¹

(Cardiovascular Department, Second Affiliated Hospital of Medicine College; 1. Lab of Medical Molecular Biology, Medicine College, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China)

MeSH Fibroblast Growth Factor, Basic; Interleukin- 6; Muscle, Smooth; Cell Division; Cooperative Behavior; Atherosclerosis

ABSTRACT **Aim** To observe the synergistic effect of basic fibroblast growth factor and interleukin- 6 on vascular smooth muscle cells proliferation. **Methods** BrdU incorporation and cell counting method were adopted to observe the effects of basic fibroblast growth factor and interleukin- 6 on the proliferation of rat aortic cultured smooth muscle cells. **Results** 0~ 10.0 $\mu\text{g/L}$ basic fibroblast growth factor and 0~ 100 $\mu\text{g/L}$ interleukin- 6 were able to promote smooth muscle cells proliferation separately, and synergistically in combination in dose- and time- dependent manner. The pro- proliferation effect reached climax at 24 hours. **Conclusion** Basic fibroblast growth factor and interleukin- 6 had synergistic effect on vascular smooth muscle cells proliferation.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖是动脉粥样硬化、经皮冠状动脉腔内球囊成形术后再狭窄、心脏搭桥术和心脏移植血管吻合口再狭窄等多种心血管疾病的病理基础。病变局部内皮细胞、VSMC、局部浸润的 T 淋巴细胞、血小板和巨噬细胞合成分泌的各种生长因子、细胞因子和血管活性物质等均能影响 VSMC 增殖^[1]。血管损伤后的 VSMC 增殖不是某一因子的结果, 而是众多因子通过极其复杂的交谈作用网络共同发挥作用的^[1, 2]。近来研究发现, 这些因子之间在促进 VSMC 增殖过程中起着协同作用, 即大大上调其促 VSMC

增殖作用, 加速病变进程^[2, 3]。在体内以 VSMC 增殖为特征的病变中, 碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)^[2] 和白细胞介素 6 (interleukin, IL- 6)^[4] 是比较重要的 VSMC 增殖促进因子, 但是 bFGF 和 IL- 6 之间对 VSMC 的增殖是否具有协同作用目前尚未见报道。本研究以培养的大鼠主动脉 VSMC 为材料, 对此进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 实验材料

雄性 Sprague- Dawley (SD) 大鼠, 150~ 250 g, 购自本校实验动物中心; DMEM 为 Gibco 公司产品; 新生小牛血清为杭州四季青生物制品公司产品; 胰蛋

白酶为 Serva 公司产品; bFGF 为 Promega 公司产品; IL-6 为 Promega 公司产品; 5-溴-2-脱氧尿嘧啶 (BrdU) 掺入标记试剂盒为 Boehringer Mannheim 公司产品。

1.2 平滑肌细胞培养和鉴定

用贴块法^[5]进行细胞培养。20%新生小牛血清+DMEM 培养基培养大鼠胸主动脉 VSMC, 15~20 天细胞融合, 以 0.25% 胰蛋白酶+0.20% EDTA 消化液消化细胞, 离心法传代, 10% 新生小牛血清+DMEM 培养基传代。平滑肌特异性抗肌动蛋白抗体免疫组织化学染色鉴定细胞。实验均采用 6 代以内的 VSMC。

1.3 BrdU 掺入法

血管平滑肌细胞以 $5.0 \times 10^6/L \times 100 \mu L$ 孔的密度种于 96 孔板, 培养 72 h 后长至次融合。0.4% 新生小牛血清+DMEM 静息 48 h, 换成 DMEM 液, 以不同剂量的 bFGF (0、0.1、0.5、1.0、5.0 和 10.0 $\mu g/L$) 和 IL-6 (0、0.01、0.10、1.0、10.0 和 100 $\mu g/L$) 刺激不同时间, 最后加入 BrdU 标记工作液 10 μL /孔, 按照试剂盒说明书操作, 即依次加入预冷细胞固定液、核酸酶工作液、抗 BrdU-POD Fab 片段工作液、工作缓冲液和过氧化物酶底物/增强剂, 以 490 nm 为参照, 于 405 nm 波长测定光密度值。并分别观察 bFGF 1.0 $\mu g/L$ 和 IL-6 1.0 $\mu g/L$ 作用 0、2、6、12、24 和 48 h 时, 对血管平滑肌细胞 2 h BrdU 掺入量的影响。

1.4 细胞生长曲线绘制

血管平滑肌细胞以 1.0×10^7 个/L $\times 1 L$ 孔的密度种于 24 孔板, 培养 12 h 后以 0.4% 新生小牛血清+DMEM 静息 48 h, 换成 DMEM 液, 加入 5.0 $\mu g/L$ bFGF 和 10 $\mu g/L$ IL-6 共同刺激, 隔天换 DMEM 液和刺激因子, 每天以 0.25% 胰蛋白酶+0.20% EDTA 液消化 4 孔细胞, 置于血球计数板内计数, 每孔重复 3 次, 取平均值, 共持续 7 天。

1.5 统计方法

所有实验重复 3 遍, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较如方差齐采用 *t* 检验, 方差不齐用 *t'* 检验。

2 结果

2.1 不同浓度碱性成纤维细胞生长因子和白细胞介素 6 对平滑肌细胞 DNA 合成的影响

碱性成纤维细胞生长因子和 IL-6 分别在 0.10~10.0 $\mu g/L$ 和 0.01~100 $\mu g/L$ 的浓度范围内均能显著增加 VSMC BrdU 掺入量, 且 BrdU 掺入量随剂量

的增加而增加, 呈典型的量效关系, 说明 bFGF 和 IL-6 促进 VSMC DNA 合成均具有剂量依赖性 (图 1, Figure 1)。同时以 1.0 $\mu g/L$ IL-6+0.10~10.0 $\mu g/L$ bFGF 和 1.0 $\mu g/L$ bFGF+0.01~100 $\mu g/L$ IL-6 共同刺激培养 VSMC, 发现 IL-6 和 bFGF 两者之间具有协同作用。例如单用 1.0 $\mu g/L$ bFGF 刺激培养的 VSMC 与空白对照组相比, 其 VSMC BrdU 掺入量增加 1.317 ± 0.093 倍, 1.0 $\mu g/L$ 浓度的 IL-6 能使 VSMC BrdU 掺入量增加 0.647 ± 0.031 倍, 而相同浓度两者合用时 VSMC 的 BrdU 掺入量增加 4.225 ± 0.390 倍 (实测值), 与两者单用时的倍数之和 2.328 ± 0.151 (相加值) 相比差异具有显著性 ($P < 0.01$)。同样 1.0 $\mu g/L$ bFGF 和不同浓度 (0.01~100 $\mu g/L$) IL-6 合用刺激 VSMC, 其 BrdU 掺入量的增加倍数与相同浓度单用时增加倍数之和相比增加 ($P < 0.001$)。

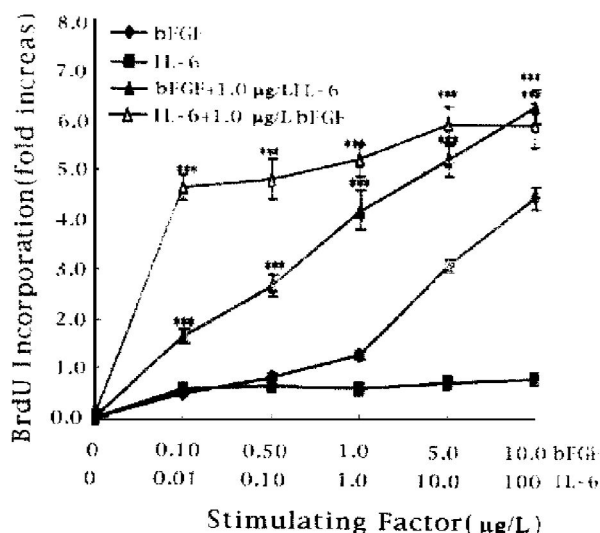


图1 碱性成纤维细胞生长因子和白细胞介素 6 促进大鼠血管平滑肌细胞 BrdU 掺入量的协同作用

Figure 1 The synergistic effect of bFGF and IL-6 on rat VSMC BrdU incorporation ($n = 4$)

2.2 不同作用时间碱性成纤维细胞生长因子和白细胞介素 6 对平滑肌细胞 DNA 合成的影响

研究发现, bFGF 和 IL-6 在所予浓度下能显著促进 VSMC BrdU 掺入, 2 h BrdU 掺入量开始增加, 24 h 时达到高峰, 其后减弱。bFGF 1.0 $\mu g/L$ 和 IL-6 1.0 $\mu g/L$ 共存 24 h 时细胞 BrdU 掺入量增加 1.23 ± 0.26 倍, 与两者相同剂量下单独刺激时 VSMC BrdU 掺入量之和相比增加 ($P < 0.01$)。两者共同作用 12 和 48 h 时也有差异 ($P < 0.05$) (表 1, Table 1)。

表 1 碱性成纤维细胞生长因子和白细胞介素 6 协同促进大鼠血管平滑肌细胞 BrdU 掺入量的时效关系

Table 1 The time- effect relationship of the synergistic effect of bFGF and IL- 6 on rat VSMC BrdU incorporation ($\bar{x} \pm s$)

Time (h)	n	bFGF	IL- 6	Additive Value	Actual Value
0	4	0 \pm 0.040	0 \pm 0.096	0 \pm 0.116	0 \pm 0.035
2	4	0.249 \pm 0.055	0.225 \pm 0.076	0.474 \pm 0.131	0.567 \pm 0.070
6	4	0.316 \pm 0.072	0.148 \pm 0.061	0.463 \pm 0.141	0.588 \pm 0.079
12	4	0.235 \pm 0.062	0.225 \pm 0.020	0.460 \pm 0.068	0.595 \pm 0.052 ^a
24	4	0.508 \pm 0.101	0.246 \pm 0.070	0.754 \pm 0.085	1.232 \pm 0.259 ^b
48	4	0.224 \pm 0.085	0.230 \pm 0.026	0.454 \pm 0.104	0.626 \pm 0.061 ^a

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with additive value.

2.3 碱性成纤维细胞生长因子和白细胞介素 6 对血管平滑肌细胞数目的影响

图 2 (Figure 2) 显示 IL- 6 和 bFGF 均能增加 VSMC 数目, 且呈时效关系, 说明 IL- 6 和 bFGF 促进 VSMC 增殖在 1 周内具有时间依赖性。同时发现 bFGF 较 IL- 6 促增殖作用更为明显, 而且两者具有协同作用($P < 0.001$)。

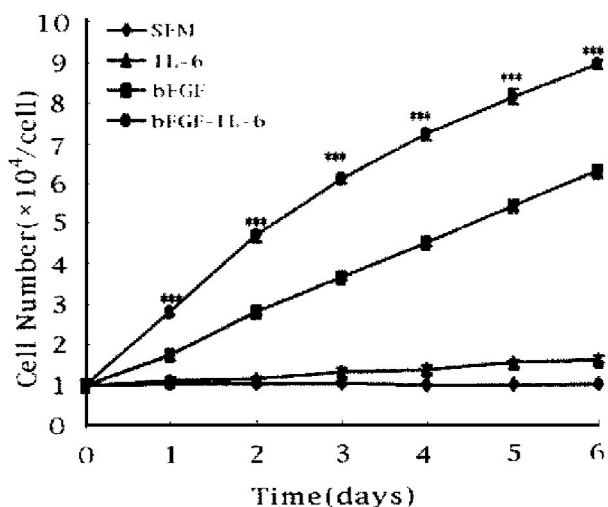
图 2 碱性成纤维细胞生长因子和白细胞介素 6 对血管平滑肌细胞计数的影响 ($n = 4$)

Figure 2 The effect of bFGF and IL- 6 on VSMC cell number

3 讨论

碱性成纤维细胞生长因子是肝素结合生长因子家族成员之一, 在体内分布广泛^[2]。近来研究表明, 碱性成纤维细胞生长因子促进血管平滑肌细胞增殖是动脉粥样硬化和再狭窄等诸多心血管疾病的发病机制之一。球囊损伤大鼠主动脉内膜后即刻注射碱性成纤维细胞生长因子能增加血管平滑肌细胞增殖

率, 增厚内膜。而损伤时静注碱性成纤维细胞生长因子抗体或腔内转染反义碱性成纤维细胞生长因子均能抑制血管平滑肌细胞增殖和内膜增生, 减少内膜中层面积比例^[6]。血管平滑肌细胞和内皮细胞是血管壁合成碱性成纤维细胞生长因子的主要细胞, 在一些病理状态下进入血管壁的细胞, 如动脉粥样硬化斑块浸润的 T 淋巴细胞和单核/巨噬细胞也能合成碱性成纤维细胞生长因子。巨噬细胞还能释放硫酸乙酰肝素降解酶等细胞外基质降解酶, 动员细胞外基质结合碱性成纤维细胞生长因子。碱性成纤维细胞生长因子能促进人、牛、大鼠等各种来源的血管平滑肌细胞增殖, DNA 合成明显增加, 细胞数目显著增多^[2]。本研究发现, 碱性成纤维细胞生长因子能呈剂量、时间依赖性地促进血管平滑肌细胞 DNA 合成, 增加细胞数目, 其明显的促血管平滑肌细胞增殖作用与已报道的研究结果相一致。

动脉粥样硬化发生过程中炎症机制和免疫机制的作用已有大量研究。细胞成份(T 细胞、B 细胞和单核/巨噬细胞)和体液成份(免疫球蛋白和激活的补体蛋白)存在于动脉粥样硬化的病灶中, 炎症细胞由血液进入血管壁, 合成分泌炎症过程中的重要介质细胞因子, 促进病变进展, 其中包括白细胞介素 6^[1,4]。白细胞介素 6 又称 B 细胞刺激因子 2、B2 干扰素或杂交瘤/浆细胞生长因子。白细胞介素 6 作用多样, 对血液系统、免疫系统、内分泌系统和机体代谢均有影响。近来研究发现, 白细胞介素 6 还参与动脉粥样硬化的发生。Rus 等^[7]免疫组织化学研究表明, 正常动脉壁即有白细胞介素 6 蛋白沉积, 动脉粥样硬化组织白细胞介素 6 表达明显增加。动脉粥样硬化病灶的主要细胞血管平滑肌细胞、巨噬细胞、内皮细胞和 T 细胞均能分泌白细胞介素 6^[7,8], 并可被血管内血流冲击血管壁产生的剪切力、血小板、凝血酶和血小板激活因子所上调^[9]。

与以往报道相似^[4,9], 本实验发现白细胞介素 6

能促进血管平滑肌细胞增殖,但其促细胞增殖活性相对碱性成纤维细胞生长因子较弱。白细胞介素6也能协同促进血管平滑肌细胞DNA合成,细胞数目增多,并在一定浓度、时间范围内呈剂量、时间依赖性,即白细胞介素6能大大增强碱性成纤维细胞生长因子促血管平滑肌细胞增殖作用。

本研究采用的BrdU掺入法是近年发展起来的DNA合成检测方法,BrdU能代替 ^3H -胸腺嘧啶掺入细胞DNA,与BrdU单抗结合后再与酶或荧光色素联接的二抗结合,相应仪器检测后即可得到DNA合成信息。与 ^3H -胸腺嘧啶掺入法相比,BrdU掺入法同样敏感可靠,但是更经济安全,无需液闪液,现已得到广泛应用^[10]。

协同作用是近年来较受关注的因子之间的相互作用方式,其中对血管平滑肌细胞增殖的协同作用研究较多。血管紧张素 E 和上皮生长因子对牛血管平滑肌细胞增殖存在协同促进作用。较弱的丝裂原胰岛素样生长因子I能显著提高碱性成纤维细胞生长因子促进血管平滑肌细胞分裂的能力。三磷酸腺苷是血管平滑肌细胞的丝裂原,与碱性成纤维细胞生长因子和白细胞介素6一样都具有协同促进增殖作用。碱性成纤维细胞生长因子通过上调血小板源性生长因子受体亚基与血小板源性生长因子-A协同促进牛血管平滑肌细胞增殖。白细胞介素6与表皮生长因子对血管平滑肌细胞增殖具有协同作用,但是白细胞介素1和血小板源性生长因子则为相加作用^[2,3]。本研究应用BrdU掺入法和细胞计数法观察了碱性成纤维细胞生长因子和白细胞介素6对大鼠主动脉血管平滑肌细胞DNA合成和细胞数目的影响,首次报道两者对血管平滑肌细胞增殖具有协同作用。

协同作用机理尚未清楚,可能与其互相促进内源性生长因子和/或特异性受体和/或受体配体结合效价上调有关。有报道碱性成纤维细胞生长因子能增加成骨样细胞MC3T3-E1细胞株白细胞介素6

合成,这可能是碱性成纤维细胞生长因子和白细胞介素6协同作用机制之一。而碱性成纤维细胞生长因子对白细胞介素6受体,白细胞介素6对碱性成纤维细胞生长因子及其受体,以及相互结合效价的影响,均有待于进一步研究探明。

参考文献

- [1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. *Nature*, 1993, **362** (29): 801-809
- [2] Reape TJ, Kanczler JM, Ward JPT, et al. IGF-1 increases bFGF-induced mitogenesis and upregulates FGFR-1 in rabbit vascular smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol*, 1996, **270**: H1141-1148
- [3] Bourcier T, Dockter M, Hassid A. Synergistic interaction of interleukin-1 and growth factors in primary cultures of rat aortic smooth muscle cells [J]. *J Cell Physiol*, 1995, **164** (3): 644-657
- [4] Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, et al. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease [J]. *Ann Intern Med*, 1998, **128** (2): 127-137
- [5] Campbell J, Campbell G, Ross R. The smooth muscle in culture [J]. *Physiol Rev*, 1979, **59**: 31-34
- [6] Rutherford C, Martin W, Salame M, et al. Substantial inhibition of neo-intimal response to balloon injury in the rat carotid artery using a combination of antibodies to platelet-derived growth factor-BB and basic fibroblast growth factor [J]. *Atherosclerosis*, 1997, **130** (1-2): 45-51
- [7] Rus HG, Vlaicu R, Niculescu F. Interleukin-6 and interleukin-8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall [J]. *Atherosclerosis*, 1996, **127** (2): 263-271
- [8] Ikeda U, Ikeda M, Seino Y, et al. Interleukin 6 gene transcripts are expressed in atherosclerotic lesions of genetically hyperlipidemic rabbits [J]. *Atherosclerosis*, 1992, **92** (2-3): 213-218
- [9] Kranzhofer R, Clinton SK, Ishii K, et al. Thrombin potently stimulates cytokine production in human vascular smooth muscle cells but not in mononuclear phagocytes [J]. *Circ Res*, 1996, **79** (2): 286-294
- [10] Kahler CM, Schratzberger P, Weidemann CJ. Response of vascular smooth muscle cells to the neuropeptide secretoneurin [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17** (10): 2029-2035

(此文1999-12-21收到,2000-07-05修回)

(此文编辑 朱雯霞)