

血小板源生长因子对人血管内皮细胞 DNA 及 胶原蛋白合成的影响

任雨笙¹, 崔芳², 杜荣增¹, 吴宗贵¹, 俞世强³, 贾国良³

(中国人民解放军第二军医大学长征医院 1. 心内科, 2. 理疗科, 上海市 200003;

3. 中国人民解放军第四军医大学西京医院心脏内外科中心, 陕西省西安市 710032)

[关键词] 细胞生物学;; 血小板源生长因子的促细胞增殖作用; 细胞培养; 氘掺入; 内皮细胞; 细胞增殖; 胶原蛋白

[摘要] 为研究血小板源生长因子对血管内皮细胞增殖及胶原蛋白合成的影响, 采用培养的人脐静脉内皮细胞, 应用氘标记胸腺嘧啶脱氧核苷和氘标记脯氨酸掺入方法, 观察血小板源生长因子 BB 对人血管内皮细胞 DNA 合成以及胶原蛋白合成的影响。结果发现, 血小板源生长因子 BB 可促进处于静止状态的人血管内皮细胞 DNA 合成, 并呈现出明显的浓度依赖关系, 在 40 $\mu\text{g/L}$ 时 DNA 的合成达到高峰, DNA 于血小板源生长因子 BB 作用 48 h 时合成最为显著。血小板源生长因子 BB 对人血管内皮细胞胶原蛋白合成无明显促进作用。结果表明, 血小板源生长因子 BB 可明显促进培养的人血管内皮细胞 DNA 合成, 而对胶原蛋白合成无明显促进作用。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

血小板源生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)是体内一种较强的促有丝分裂剂和化学诱导剂, 可刺激结缔组织细胞的分裂和增殖, 与机体组织的生长发育、创伤愈合和动脉粥样硬化的发生发展有密切的关系^[1]。本实验采用培养的人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, hUVEC), 应用氘标记胸腺嘧啶脱氧核苷(tritium labelled thymidine, ³H-TdR)和³H-脯氨酸掺入合成的方法, 观察 PDGF-BB 对 hUVEC DNA 合成以及胶原蛋白合成的影响, 以了解 PDGF 在血管细胞生物学上的作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

血小板源生长因子 BB (中国人民解放军第四军医大学生物技术中心), DMEM 细胞培养基(Gibco Co.), ³H-TdR (中科院上海原子能研究所), ³H-脯氨酸(中国原子能研究所), 胰蛋白酶(Gibco Co. 进口分装), LS6500 型液体闪烁计数器(Beckman Co.), 多头

细胞样品收集仪(浙江绍兴东浦医疗仪器厂), Shell - Lab2323 型 CO₂ 孵箱 (Sheldon MFG Inc. USA)。

1.2 血管内皮细胞的培养及接种

在无菌条件下, 取健康新生儿脐带, 胰蛋白酶消化法收集 hUVEC, 待 hUVEC 长成致密的呈典型铺路石样的细胞层时, 进行传代培养, 实验采用第 3~8 代细胞。用 10% FBS-DMEM 将 hUVEC 调整细胞数为 2.5×10^7 个/L, 接种于 96 孔培养板, 每孔加入细胞悬液 0.2 mL, 放入 CO₂ 培养箱中孵育 24 h, 镜下观察细胞贴壁生长, 备用。

1.3 氘标记胸腺嘧啶脱氧核苷和氘标记脯氨酸掺入法检测细胞 DNA 合成及胶原蛋白合成

将贴壁生长的 hUVEC 弃去原培养基, 用 DMEM 培养基洗涤细胞 3 次, 换含 0.5% 灭活 FBS-DMEM 培养基继续培养细胞 24 h, 使 hUVEC 同步于 G₀/G₁ 期。浓度效应组加入 1% 灭活 FBS-DMEM 培养基, 同时加入 PDGF-BB 使其终浓度分别为 1、10、20、30 和 40 $\mu\text{g/L}$, 培养 24 h。时间效应组加入含有 30 $\mu\text{g/L}$ PDGF-BB 的 1% 灭活 FBS-DMEM 培养基, 分别培养 12、24、36 和 48 h。空白对照组加入 1% 灭活 FBS-DMEM 培养基。每种浓度和每一时间点作 3 个复孔。于培养结束前 6 h 分别加入 1.85×10^4 Bq/孔的³H-TdR 和³H-脯氨酸, 继续孵育细胞 6 h。培养结束后用多头细胞收集仪收集细胞, 在 LS6500 型闪烁计数器上进行放射强度测定, 结果用每分钟记数表示。

1.4 统计学处理

[收稿日期] 2002-07-30 [修回日期] 2002-12-20

[基金项目] 上海市科技发展基金(014119072)资助

[作者简介] 任雨笙, 男, 1963 年出生, 浙江省东阳市人, 医学博士, 副主任医师、副教授, 从事血管细胞生物学和冠心病诊断及治疗的研究, 联系电话: 021-63610109 转 73202, E-mail: ys_ren@citiz.net。崔芳, 女, 1964 年出生, 黑龙江省海伦县人, 医学硕士, 主治医师、讲师, 从事心脑血管疾病康复治疗的研究。杜荣增, 男, 1963 年出生, 江苏省溧阳市人, 医学博士, 主治医师、讲师, 从事高血压和冠心病的诊断及防治研究。

数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。用 SPSS 软件包对数据进行 t 检验和方差分析等处理。

2 结果

与对照组相比, 1 $\mu\text{g/L}$ PDGF-BB 对 hUVEC 合成 DNA 无明显的促进作用 ($P > 0.05$), 在 1~40 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内 PDGF-BB 对 hUVEC DNA 合成呈现明显的浓度依赖关系 (表 1, Table 1)。30 $\mu\text{g/L}$ PDGF-BB 作用于 hUVEC 12 h 时无明显促进细胞 DNA 合成的作用 ($P > 0.05$), 随着 PDGF-BB 作用时间的延长细胞 DNA 合成逐渐增多, 48 h 时 DNA 合成量最多 (图 1, Figure 1)。随着 PDGF-BB 浓度的增加, ^3H -胸氨酸掺入值也略有增加, 但各浓度组与对照组相比无显著差别 ($P > 0.05$, 表 1, Table 1)。

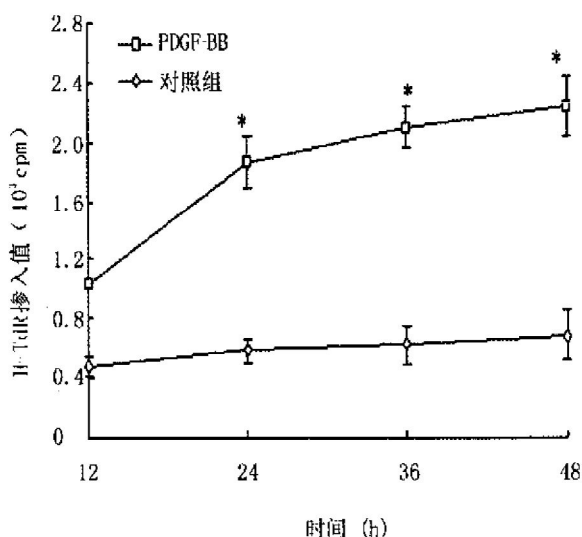


图 1. 血小板源生长因子 BB (30 $\mu\text{g/L}$) 对人脐静脉内皮细胞 DNA 合成的时间效应 与对照组比较, * : $P < 0.01$.

表 1. 血小板源生长因子 BB 对人脐静脉血管内皮细胞 DNA 及胶原蛋白合成的影响 (每分钟记数) ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组 别	^3H -TdR 掺入值	^3H -脯氨酸掺入值
对照组	534.2 \pm 49.9	314.6 \pm 54.3
PDGF-BB 1 $\mu\text{g/L}$	704.7 \pm 68.4	334.2 \pm 59.3
10 $\mu\text{g/L}$	823.6 \pm 87.5 ^a	339.5 \pm 67.2
20 $\mu\text{g/L}$	1 114.9 \pm 127.3 ^b	356.4 \pm 89.3
30 $\mu\text{g/L}$	1 361.7 \pm 119.2 ^b	384.3 \pm 71.3
40 $\mu\text{g/L}$	1 455.8 \pm 243.5 ^b	387.3 \pm 49.0

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照相比。

3 讨论

血管内皮细胞是血管壁的重要组成细胞, 细胞外基质在维持血管的正常结构、新陈代谢和生物学功能等方面发挥非常重要的作用。PDGF 是一个极强的促有丝分裂素, 在细胞增殖和转化、组织损伤修复以及动脉粥样硬化的形成中均起重要的作用^[2]。本实验结果发现, PDGF-BB 可明显促进 hUVEC 的 DNA 合成, 且在 1~40 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内存在着浓度依赖效应。PDGF-BB 促进 hUVEC DNA 的合成还存在着时间效应, 在 PDGF-BB 作用初期细胞 DNA 合成就开始增加。随着作用时间延长细胞 DNA 的合成增多, 48 h 达到高峰。PDGF 可明显促进 DNA 的合成, 可使处于 G_0/G_1 期的细胞具有复制 DNA 的潜能, 即成为“感受态”细胞, 并可能通过诱导早期基因如 $c\text{-myc}$ 、 $c\text{-fos}$ 和 $c\text{-jun}$ 等癌基因的表达及激活受体的酪氨酸磷酸化等作用促进细胞的有丝分裂^[3,4]。PDGF 除了促进某些细胞 DNA 合成外, 同时还促进一些细胞的蛋白质和胶原的合成, 促进人血管成纤维胶原的合成^[5]。本实验结果发现, PDGF-BB 对 hUVEC 的胶原合成无明显的促进作用。血管内皮细胞具有合成胶原的能力, 在血管壁的 6 种胶原中, 血管内皮细胞可以合成除了 ν 型胶原外的另外 5 种胶原^[6]。本实验发现 PDGF-BB 对 hUVEC 的胶原合成无明显的促进作用, 这可能与血管内皮细胞种属间的差异、不同细胞在胶原合成的时间和数量上有所不同有关; 抑或是 PDGF-BB 是否对 hUVEC 胶原合成总量无明显作用, 而在调节不同类型胶原合成中有作用。这需要进一步研究和探讨, 如采用无血清培养基进行培养, 并用特异性抗体对胶原进行分型等。

[参考文献]

- [1] Inoue K, Cynshi O, Kawabe Y, Nakamura M, Miyauchi K, Kimura T, et al. Effect of BO-653 and probucol on $c\text{-MYC}$ and PDGF-A messenger RNA of the iliac artery after balloon denudation in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, 2002, **161** (2): 353-363
- [2] 杨国君, 张 琪, 丁金凤. 动脉壁正常区与脂斑区血小板源性生长因子及其受体基因表达的比较. *中国动脉硬化杂志*, 1995, **3** (4): 283-286
- [3] 谢良地, 吴可贵, 陈达光. 血小板源生长因子诱导血管平滑肌细胞迁移及机制. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6** (1): 10-14
- [4] Peppel K, Zhang L, Huynh TT, Huang X, Jacobson A, Brain L, et al. Over-expression of g protein-coupled receptor kinase-2 in smooth muscle cells reduces neointimal hyperplasia. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, **34** (10): 1-399
- [5] 任雨笙, 吴宗贵, 崔 芳, 贾国良, 俞世强, 汤朝武, 李 波. 血小板源生长因子对血管成纤维细胞 DNA 及胶原蛋白合成的影响. *中国病理生理杂志*, 2002, **18** (11): 1 377-380
- [6] Katsuda S, Okada Y, Minamoto T, Oda Y, Matsui Y, Nakanishi I. Collagens in human atherosclerosis. Immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Arterioscler Thromb*, 1992, **12** (4): 494-502

(此文编辑 朱雯霞)