

## 碱性成纤维细胞生长因子对大鼠心脏微血管内皮细胞血管形成及血管内皮生长因子受体 1 的影响

王延琳<sup>1</sup>, 杨向红<sup>1</sup>, 柳爱华<sup>1</sup>, 王跃中<sup>1</sup>, 张亚佳<sup>1</sup>, 刘政操<sup>1</sup>

(1. 中国医科大学附属盛京医院实验病理学教研室, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 碱性成纤维细胞生长因子; 心脏微血管内皮细胞; 管腔样结构; 治疗性血管新生; 血管内皮生长因子; 血管内皮生长因子受体

[摘要] 目的 探讨碱性成纤维细胞生长因子对诱导大鼠心脏微血管内皮细胞形成管腔样结构的影响, 以及对血管内皮生长因子受体 Flt-1 的作用。方法 分离、培养大鼠心脏微血管内皮细胞。应用 Matrigel 检测不同浓度碱性成纤维细胞生长因子作用后心脏微血管内皮细胞形成管腔的情况。逆转录聚合酶链反应检测各组血管内皮细胞 Flt-1 mRNA 的表达量。结果 应用 Matrigel 可诱导心脏微血管内皮细胞管腔样结构形成, 随着碱性成纤维细胞生长因子浓度升高(0.5、10 和 20  $\mu\text{g/L}$ ), 管腔样结构形成的数量逐渐增多, 当碱性成纤维细胞生长因子浓度达到 40  $\mu\text{g/L}$  时管腔样结构的数量有所减少( $P < 0.05$ )。Flt-1 mRNA 的表达量随碱性成纤维细胞生长因子作用浓度的升高(0.5、10 和 20  $\mu\text{g/L}$ ) 而逐渐增高, 当碱性成纤维细胞生长因子浓度达到 40  $\mu\text{g/L}$  时其 mRNA 水平有所降低( $P < 0.05$ )。结论 应用 Matrigel 可在体外诱导培养的大鼠心脏微血管内皮细胞形成管腔样结构。碱性成纤维细胞生长因子对大鼠心脏微血管内皮细胞形成管腔样结构有促进作用, 并在一定范围内呈剂量依赖性关系。碱性成纤维细胞生长因子影响大鼠心脏微血管内皮细胞膜受体 Flt-1 的表达, 在一定范围内亦呈剂量依赖性, 且这种剂量依赖性同微血管内皮细胞管腔样结构形成的数量一定范围内呈现一致性。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effect of Basic Fibroblast Growth Factor on Inducing Mouse Cardiac Microvascular Endothelial Cells to Form New Blood Vessels and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1

WANG Yan-Lin, YANG Xiang-Hong, LIU Ai-Hua, WANG Yue-Zhong, ZHANG Ya-Jia, and LIU Zheng-Cao

(Department of Pathology, College of Basic Medicine, China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Basic Fibroblast Growth Factor; Cardiac Microvascular Endothelial Cells; Tube Structure; Therapeutic Angiogenesis; Vascular Endothelial Growth Factor; Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) on inducing cardiac microvascular endothelial cells (CMEC) to form new blood vessels and the role of vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1, Flt-1).

**Methods** Mouse CMEC were isolated and cultured. CMEC was induced to develop tube structure by using Matrigel so as to detect the influence of bFGF on neovascularization. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assayed the expression of Flt-1 mRNA.

**Results** CMEC can be induced to develop tube structure by Matrigel in vitro. The number of vessel gradually increased with the concentrations of bFGF step up (0, 5, 10, 20  $\mu\text{g/L}$ ) and decreased when bFGF was 40  $\mu\text{g/L}$  ( $P < 0.05$ ). The expression of Flt-1 mRNA gradually increased with the concentrations of bFGF step up (0, 5, 10, 20  $\mu\text{g/L}$ ) and decreased when bFGF was 40  $\mu\text{g/L}$  ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** Mouse CMEC can be induced to develop tube structure by Matrigel in vitro. Mouse bFGF can promote CMEC to form new blood vessels and in certain range show a dose-dependent manner.

bFGF can enhance the expression of Flt-1 and in certain range show a dose-dependent manner; this dose-dependent manner is similar to that of new blood vessels' quantity.

治疗性血管新生是将外源性血管新生诱导因子转入组织中增强缺血区的血管形成, 改善缺血心肌的血流进而改善心肌功能, 用于处理传统血运重

建技术难以解决的缺血性心脏病<sup>[1]</sup>。多种血管生成促进因子参与调节心脏新生血管形成, 用于治疗性血管新生。其中, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF) 是最重要的并且研究较多的两种血管生成促进因子, 且两者之间存在着协同作用<sup>[2]</sup>。已有研究表明, 内外源性的 bFGF 均能通过诱导 VEGF 的产生, 上调 VEGF 受体

[收稿日期] 2006-06-19

[修回日期] 2006-10-26

[作者简介] 王延琳, 硕士。通讯作者杨向红, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管疾病发病机制的病理学研究, E-mail 为 xhyang4933@vip.sina.com.cn。柳爱华, 硕士, 现在沈阳市妇幼保健所工作。

(VEGF receptor, VEGFR) 之一 VEGFR-2(Flk-1/KDR) 的表达, 影响血管形成<sup>[3]</sup>, 但对 VEGF 的另一重要受体 VEGFR-1(Flt-1) 的调节作用尚未有明确的报道。本实验在体外培养大鼠心脏微血管内皮细胞(cardiac microvascular endothelial cells, CMEC), 并应用 Matrigel 建立诱导血管腔样结构形成的体外培养体系, 研究血管生成促进因子 bFGF 对诱导 CMEC 形成管腔样结构的影响, 和 bFGF 对心脏微血管内皮生长因子受体 Flt-1 的作用, 进而探讨 bFGF 促进血管形成的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Wistar 大鼠(中国医科大学动物部), Ⅲ型胶原酶(美国 sigma 公司), 胰蛋白酶(华美生物工程公司), Matrigel™ Basement Membrane Matrix(美国 Becton Dickison 公司), DMEM 培养基(美国 Gibco 公司), 胎牛血清(天津生物化学制品厂), 基因重组牛 bFGF(长春长生基因药业有限公司)。

### 1.2 大鼠心脏微血管内皮细胞的培养和鉴定

心脏微血管内皮细胞的培养参考文献[4], 取 Wistar 大鼠(150~200 g), 腹腔麻醉后剪开胸腔, 无菌条件下取出心脏, 去除左右心房、右心室及左心室外侧 1/4, PBS 冲洗干净, 剪碎剩余组织, 0.1% Ⅲ型胶原酶消化 45~55 min(37℃条件下), 0.05% 胰酶消化 40~45 min(37℃条件下), 100 μm 滤网过滤, 离心(100 g, 15 min), 弃上清, 用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液制成细胞悬液, 接种于培养皿中培养(37℃, 5% CO<sub>2</sub>), 待细胞长至亚汇合状态时用 0.125% 胰酶(含 0.02% EDTA)传代, 3~5 代细胞用于实验。CMEC 鉴定根据倒置相差显微镜下观察培养细胞的生长状态, 第Ⅰ因子相关抗原免疫细胞化学法, 应用 Matrigel 建立的管腔样结构, 鉴定培养的内皮细胞。

### 1.3 实验分组

根据不同的实验因素浓度设计成浓度效应组: 选用 0、5、10、20 和 40 μg/L bFGF 的 DMEM 培养基(均不含血清), 分别作用 24 h(其中 0 μg/L 的 bFGF 组即为对照组)。

### 1.4 应用 Matrigel 诱导管腔样结构形成的体外培养体系

1.4.1 Matrigel 培养板的准备 将冻存于 -20℃ 的 Matrigel 于使用前置于 4℃ 过夜, 融化成黄色胶状液体。根据本实验室的经验, 用预冷的微量进样器

在短时间内迅速将 Matrigel 加入预冷的 24 孔培养板内, 每孔 800 μL/m<sup>2</sup>(厚度约为 0.5 mm), 轻摇培养板使基质胶铺平。然后将培养板放入 37℃ 孵育箱内, 30 min 后即可使用。

1.4.2 管腔样结构形成的诱导和计数 以  $5.0 \times 10^5$ /m<sup>2</sup> 的细胞量接种于预涂有 Matrigel 的培养板内进行培养, 12 h 后第一次换液, 48 h 后再换液, 加入终浓度分别含 0、5、10、20 和 40 μg/L bFGF 的 DMEM 培养液, 分别作用 24 h。倒置相差显微镜观察, 每个实验组在镜下 100 倍视野选取 3 处管腔密集视野, 计数每个视野的管腔数。

### 1.5 逆转录聚合酶链反应法检测各组血管内皮细胞 Flt-1 mRNA 表达量

以  $5.0 \times 10^5$ /m<sup>2</sup> 的细胞量接种于 50 mL 培养瓶内进行培养, 12 h 后第一次换液, 以后每 24 h 换液一次, 待细胞接近亚汇合状态, 施加实验因素作用 24 h。用 Trizol(Gibco BRL 公司)分别抽取各组细胞的总 RNA, 按逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒(DRR023A TaKaRa 公司)逆转录成 cDNA, 进行 PCR 扩增反应。引物由上海博亚生物技术有限公司合成, Flt-1 引物序列为: 上游引物 5'-CGGGACAAGG-GACTCTAG-3', 下游引物 5'-TGAGGGATGCCATACACG-3'; 预扩增产物长度为 473 bp。以 β-actin(690 bp)作为内参照, 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 用凝胶自动成像及分析系统扫描, Flt-1 基因表达量用相对于 β-actin 基因表达量的相对表达值表示。

### 1.6 统计学分析

所有实验至少重复 3 次, 采用 SPSS13.0 统计软件对管腔样结构形成数量和各组血管内皮细胞 Flt-1 mRNA 表达量的差异行单因素方差分析(*t* 检验)。

## 2 结果

### 2.1 心脏微血管内皮细胞的鉴定

倒置相差显微镜下观察, 普通明胶上培养时, 原代培养的细胞需 5~7 天, 传代培养的细胞需 3~4 天达到亚汇合状态。细胞呈短梭形或多角形, 大小均匀, 没有重叠及向多层生长的倾向, 单层排列成铺路石样结构(图 1)。应用 Matrigel 可在体外诱导大鼠 CMEC 管腔样结构形成, 细胞在培养后 24 h 即可建立稳定的、相互连接的血管网络, 细胞间界限不清, 但与普通明胶上生长的内皮细胞相比, 在 Matrigel 上生长的内皮细胞生长周期较短。第Ⅰ因子免疫细胞化学法检查, 细胞的胞质和核膜周围被染成

棕褐色, 细胞核呈蓝色(图 2)。

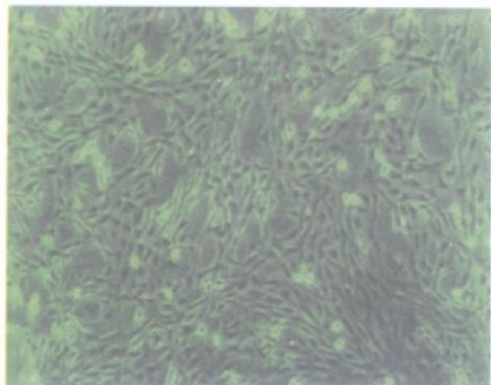


图 1. 普通明胶上生长的心脏微血管内皮细胞(100×)



图 2. 免疫细胞化学法鉴定心脏微血管内皮细胞

## 2.2 碱性成纤维细胞生长因子对培养的心脏微血管内皮细胞管腔样结构形成的影响

应用 Matrigel 诱导大鼠 CMEC 管腔样结构形成, 结果发现分别作用 24 h 后, 对照组管腔样结构形成极少(图 3A), 不同浓度 bFGF(5、10、20、40  $\mu\text{g/L}$ ) 组管腔样结构形成的数量均高于对照组, 分别为对照组的 1.8、2.8、4.9 和 4.1 倍( $n=5$ ,  $P<0.05$ )。随着 bFGF 浓度不断升高, 管腔样结构形成的数量逐渐增多, 当 bFGF 浓度达到 20  $\mu\text{g/L}$  时, CMEC 形成的管腔样结构数目最多(图 3B), 当 bFGF 浓度达到 40  $\mu\text{g/L}$  时, CMEC 形成的管腔样结构数目有所减少(表 1)。

表 1. 心脏微血管内皮细胞管腔样结构的形成情况

bFGF 浓度 ( $\mu\text{g/L}$ )	管腔样结构形成的数量 (个/100 倍视野)
0 (对照组)	3.0 $\pm$ 1.0
5	5.0 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>
10	8.1 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup>
20	14.4 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup>
40	12.0 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>

a 为  $P<0.05$ , 与对照组比较。

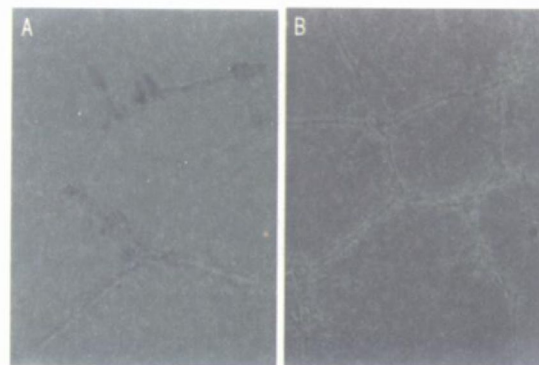


图 3. 心脏微血管内皮细胞管腔样结构的形成情况(100×)

## 2.3 各组心脏微血管内皮细胞 Flt-1 mRNA 水平

对照组 Flt-1 mRNA 表达量较低, 施加实验因素后 Flt-1 mRNA 的表达量均明显高于对照组, 不同浓度 bFGF(5、10、20、40  $\mu\text{g/L}$ ) 组 Flt-1 条带灰度值分别为对照组的 6.5、8.9、13.4 和 11.1 倍( $n=5$ ,  $P<0.05$ )(图 4)。由此可见, 在一定范围内, 随着 bFGF 浓度的增加 Flt-1 mRNA 表达量升高, 当 bFGF 浓度为 40  $\mu\text{g/L}$  时, Flt-1 mRNA 表达量反而减少(表 2)。

表 2. 心脏微血管内皮细胞 Flt-1 mRNA 水平

bFGF 浓度 ( $\mu\text{g/L}$ )	Flt-1 mRNA 相对值
0 (对照组)	92 $\pm$ 5
5	610 $\pm$ 26 <sup>a</sup>
10	906 $\pm$ 21 <sup>a</sup>
20	1 363 $\pm$ 20 <sup>a</sup>
40	1 104 $\pm$ 24 <sup>a</sup>

a 为  $P<0.05$ , 与对照组比较。

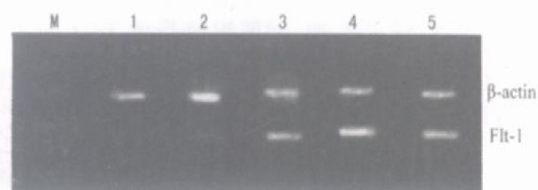


图 4. 逆转录聚合酶链反应法检测心脏微血管内皮细胞的 Flt-1 mRNA 水平 M 为相对分子质量 Marker, 1~5 分别为 0、5、10、20 和 40  $\mu\text{g/L}$  碱性成纤维细胞生长因子。

## 3 讨论

血管形成有三种不同模式: 血管新生(angiogenesis)、血管发生(vasculogenesis)及小动脉生成(arteriogenesis)。血管形成的这三种模式分别涉及不同的分子及细胞机制, 多种血管生长促进因子参与其调节过程, 其中 VEGF 和 bFGF 是最重要的血管生长促

进因子。

碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)属于成纤维细胞生长因子家族(fibroblast growth factors, FGF),是体内最为有效的血管生长因子之一,参与新生血管形成过程的多个环节<sup>[5]</sup>。本实验应用Matrigel观察bFGF对诱导CMEC管腔样结构形成的影响,结果提示,bFGF参与调节CMEC管腔样结构的形成,且这种调节在一定范围内呈现非线性的剂量依赖性,这可能与内皮细胞自身对bFGF的反应时间效果有关。当bFGF达到一定浓度(本实验结果为20  $\mu\text{g/L}$ )后,增加bFGF的浓度(40  $\mu\text{g/L}$ )管腔样结构形成的数目反而减少,这提示bFGF对大鼠CMEC管腔样结构的形成具有双向调节作用。

研究发现,bFGF在体内外均能诱导VEGF的合成,调控VEGF及其受体的表达。VEGF是内皮细胞特异性的有丝分裂原,其参与新生血管形成的生物学活性是与其两个重要受体结合后发挥作用的,即VEGFR-1(Flt-1)和VEGFR-2(Flk-1/KDR)。bFGF对KDR的促进作用已有较清楚的研究,但对Flt-1的作用还存在争议。VEGF与VEGFR-1结合,通过VEGFR-1对内皮细胞产生趋化作用,这样VEGF的浓度梯度决定内皮细胞的迁移和出芽方向,增加血管内皮细胞通透性,使血管内的蛋白外渗,形成内皮细胞迁移的支架和血管生成的临时基质<sup>[6]</sup>。为了进一步研究bFGF诱导内皮细胞管腔样结构形成的分子机制,探讨可能的作用途径,本实验选择VEGF的受体VEGFR-1(Flt-1)作为研究对象。

本实验选用体外培养的大鼠CMEC,用免疫细胞化学方法检测施加不同浓度的bFGF(0、5、10、20和40  $\mu\text{g/L}$ )分别作用24 h后CMEC膜上VEGF受体Flt-1的表达。结果发现,对照组膜受体Flt-1的表达接近阴性,不同浓度的bFGF(5、10、20、40  $\mu\text{g/L}$ )组膜受体Flt-1的表达为弱阳性,组间差别不明显,不具有统计学意义。为了量化比较各组间Flt-1表达量的差别,本实验应用RT-PCR法检测Flt-1 mRNA的表达量,结果发现,bFGF调节CMEC膜VEGF受体Flt-1的表达量,且在一定范围内呈现非线性的剂量

依赖性,当bFGF达到一定浓度后(本实验结果为20  $\mu\text{g/L}$ ),增加bFGF的浓度(40  $\mu\text{g/L}$ )CMEC的膜受体Flt-1 mRNA水平有所下降。该结果与应用Matrigel观察bFGF对诱导CMEC管腔样结构形成数量的结果相平行。相关的原位杂交研究<sup>[7]</sup>也解释了本实验中对照组膜受体Flt-1 mRNA量的低表达现象。在bFGF的作用下随着Flt-1 mRNA表达量的增加微血管内皮细胞管腔样结构形成的数量也增加,这可能是Flt-1具有调节内皮细胞之间及内皮细胞与基底膜之间相互作用,在内皮细胞形成管腔样排列并维持该正常结构时发挥作用,本实验结果提示Flt-1 mRNA的表达量与内皮细胞管腔样结构的形成有关。近年研究显示,VEGF和bFGF联合应用于治疗性血管新生,可获得比使用单一生长因子更加成熟和稳定的新生血管网,但二者相互协同促进血管生成作用的分子机制仍不十分清楚。本实验结果提示,bFGF可促进大鼠心脏微血管的新生,其促进管腔样结构形成的分子机制之一是通过上调VEGF受体Flt-1的表达,而Flt-1与CMEC形成成熟的新生血管关系密切。

#### [参考文献]

- [1] Syed IS, Sanborn TA, Rosengart TK. Therapeutic angiogenesis: a biologic bypass [J]. *Cardiology*, 2004, **101** (1-3): 131-143
- [2] Melillo G, Scoccianti M, Kovesdi I, Safi J Jr, Riccioni T, Capogrossi MC. Gene therapy for collateral vessel development [J]. *Cardiovasc Res*, 1997, **35** (3): 480-489
- [3] Ryuto M, Ono M, Izumi H, Yoshida S, Weich HA, Kohno K, et al. Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells: possible roles of SP-1 [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271** (45): 28 220-228
- [4] Nishida M, Carley WW, Gerritsen ME, Ellingsen O, Kelly RA, Smith TW. Isolation and characterization of human and rat cardiac microvascular endothelial cells [J]. *Am J Physiol*, 1993, **264** (2 Pt2): H639-H652
- [5] Slavin J. Fibroblast growth factors: at the heart of angiogenesis [J]. *Cell Biol Int*, 1995, **19** (5): 431-444
- [6] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors [J]. *FASEB J*, 1999, **13** (1): 9-22
- [7] Brown LF, Olbricht SM, Berse B, Jackman RW, Matsuoka G, Tognazzi KA, et al. Overexpression of vascular permeability factor (VPF/VEGF) and its endothelial cell receptors in delayed hypersensitivity skin reactions [J]. *J Immunol*, 1995, **154** (6): 2 801-807

(此文编辑 许雪梅)