

## 人脐静脉内皮细胞条件培养液对离体平滑肌细胞增殖的影响

丛祥凤 张春玲 张英珊

(中国医学科学院 中国协和医科大学 心血管病研究所 阜外心血管病医院, 北京 100037)

### Effect of Endothelial Cell Conditioned Medium on the Proliferation of in Vitro Smooth Muscle Cells

CONG Xiang-Feng, ZHANG Chun-Ling and ZHANG Ying-Shan

(Cardiovascular Institute and Fu Wai Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100037, China)

#### ABSTRACT

**Aim** The effect of confluent endothelial cell conditioned medium on the proliferation of cultured smooth muscle cells was studied in this article.

**Methods** The conditioned medium of human umbilical vein endothelial cells (hUVEC-CM) was collected and fractionated into 3 fractions; namely A, containing proteoglycan sulfate, proteodermatan sulfate (DSPG) and proteochondroitin-dermatan sulfate (CS-DSPG), B (containing HSPG) and C (containing DSPG and CS-DSPG), by DEAE-Sephacelion-exchange chromatography with NaCl gradient elution. Effect of hUVEC-CM on cultured human aortic smooth muscle cell (hASMC) proliferation was studied by cell count and  $^3\text{H}$ -TdR incorporation.

**Results** All 3 fractions of hUVEC-CM could inhibit hASMC proliferation, but the percentages of inhibition were in the order of  $B > A > C$ .

**Conclusion** HSPG is the major component of hUVEC-CM in the inhibition of hASMC growth.

**KEY WORDS** Conditioned medium; Cell proliferation; Inhibition percentage.

响,在收集人脐静脉内皮细胞条件培养液后,用DEAE-Sephacel 离子交换柱和不同浓度的NaCl溶液梯度洗脱,分为A液(含硫酸乙酰肝素蛋白聚糖、硫酸皮肤素蛋白聚糖和硫酸软骨素-硫酸皮肤素蛋白糖)、B液(只含较高浓度的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖)和C液(含硫酸皮肤素蛋白聚糖和硫酸软骨素-硫酸皮肤素蛋白聚糖)三种成分,用 $^3\text{H}$ -TdR掺入法及细胞计数法分别观察上述三种培养液对培养的人胎儿主动脉平滑肌细胞增殖的影响。发现三种培养液对培养的人胎儿主动脉平滑肌细胞的增殖均有抑制作用,抑制程度依次为B液>A液>C液。结果提示,在人脐静脉内皮细胞条件培养液抑制人胎儿主动脉平滑肌细胞增殖中,硫酸乙酰肝素蛋白聚糖起主要作用。

**关键词** 条件培养液; 细胞增殖; 抑制率

正常的血管壁,内皮细胞覆盖其腔面形成静止的单层,中膜的平滑肌细胞也处于静止的生长状态。但内皮损伤后平滑肌细胞增殖是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)病变发生的启动因素<sup>[1]</sup>。Eisenstein等<sup>[2]</sup>从动脉壁的内膜分离出刺激和抑制平滑肌细胞生长的物质。Castellot等<sup>[3]</sup>研究发现培养的牛动脉内皮细胞产生刺激和抑制大鼠的动脉平滑肌细胞增殖的物质,抑制物质类似于肝素。为进一步研究内皮细胞对血管平滑肌细胞增殖的抑制作用,我们观察了培养汇合的原代人脐静脉内皮细胞条件培养液(human umbilical vein endothelial cell-conditioned medium, hUVEC-CM)对培养的人胎儿主动脉平滑肌细胞(human aortic smooth muscle cell, hASMC)增殖的影响。

**摘要** 为了探讨培养汇合后的人脐静脉内皮细胞条件培养液对培养的人胎儿主动脉平滑肌细胞增殖的影响

#### 1 材料与方法

## 1.1 试剂及材料

M199 培养粉、DEME(Gibco)、胎牛血清(sigma)、胰蛋白酶(Difco)、混合人血清(天津血研所)、Sephadex G50、DEAE-Sephacel(Pharmacia),其它均为北京化工厂 AR 级产品。

## 1.2 方法

**1.2.1 人脐静脉内皮细胞的培养<sup>[1]</sup>** 新生儿脐带(产后 48 h 内),注入 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.0)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(1 000 r/min, 5 min),弃上清,加入含 20%人血清 10%胎牛血清的 M199 培养液接种于塑料培养瓶(25 cm<sup>2</sup>,细胞数约 8×10<sup>5</sup>,95%空气,5%CO<sub>2</sub>,37℃)培养,每隔 2~3 天换液一次,7~10 天汇合后换培养液(细胞密度为 10×10<sup>5</sup> 个/L)继续培养 48 h,将培养液(hUVEC-CM)取出备用。

### 1.2.2 hUVEC-CM 的处理<sup>[2]</sup>

**1.2.2.1 去除小分子物质** 每次取一定体积的 hUVEC-CM 以 Sephadex-G50 柱(0.8 cm×10 cm,床体积 8 ml)分离。以含 0.15 mol/L NaCl,0.05 mol/L NaCl 的 8 mol/L 尿素液(pH 6.0)洗脱。分部收集排阻部分。

**1.2.2.2 DEAE-Sephacel 离子交换柱层析** 将经 Sephadex G-50 柱分离的排阻部分等体积分成二份,每份样品分别再以 DEAE-Sephacel 离子交换柱层析(0.9 cm×10 cm,床体积 2 ml),以 NaCl 浓度梯度洗脱(0.15~1.5 mol/L NaCl 在上述尿素液中)。共分别收集 A、B 及 C 三部分培养液,其洗脱液的 NaCl 浓度分别为 0.16~0.45、0.16~0.28 及 0.29~0.45 mol/L。

**1.2.2.3 培养液的配制** 以 0.15 mol/L NaCl,0.05 mol/L NaAc 的 8 mol/L 尿素液将 A 和 C 液调成相同体积,再分别用蒸馏水透析(透析袋截断分子量 3 500),最后以双蒸馏水透析至透析外液电导与双蒸馏水接近为止。取一定量 M199 培养粉分别溶于 A 液、B 液和 C 液中,以 0.45 μm 滤膜过滤,4℃贮存备用。

**1.2.3 hASMC 的培养及其抑制试验** 无菌取出水囊引产健康胎儿(>26 周)的胸主动脉,以含 10%人血清、10%胎牛血清的 DMEM 液贴块培养(5% CO<sub>2</sub>, 95%空气,37℃)。待细胞生长汇合后,用 0.125%胰蛋白酶和 0.02%EDTA 液消化分散传代,传代后改用 5%人血清、5%胎牛血清的 DMEM 液培养,每代间隔 4~5 天,传代细胞密度 5×10<sup>5</sup> 个/25 cm<sup>2</sup>。将第 4 代(T<sub>4</sub>)hASMC 以 7×10<sup>3</sup> 细胞/孔,接种于 24 孔培养板中,用 5%人血清、5%胎牛血清的 DMEM 液培养 24 h,然后接含 0.2%人血清、0.2%胎牛血清的 DMEM

培养 72 h(将 hASMC 抑制在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期)。每孔用 M199 液洗 2 遍后,实验分为二组:①实验组分别加入 1ml 上述含 A、B 及 C 液的 M199 液(含 5%人血清和 5%胎牛血清),②对照组加入 1ml 不含 A、B、C 液的 M199 液,继续培养。

**1.2.4 细胞计数及 H<sup>3</sup>-TdR 掺入法** 培养 48 h 后,用细胞计数法观察 A、B 及 C 液对培养不同时间(48、72 及 96 h)的 hASMC 增殖的影响。用 H<sup>3</sup>-TdR 掺入法<sup>[3]</sup>,每孔加 0.5 μCi H<sup>3</sup>-TdR 观察上述实验组的三种液体对培养 48 h hASMC 的 H<sup>3</sup>-TdR 掺入影响(LKB 1215 液体闪烁计数器测 cpm 值)。培养液中净生长细胞数及 hASMC 生长的百分抑制率按下式计算:

净生长细胞数=实验至某天细胞数-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>细胞数

百分抑制率=(1- $\frac{\text{实验组净生长细胞数}}{\text{对照组净生长细胞数}}$ )×100%

## 2 结果

### 2.1 A、B 和 C 三种培养液的主要成分

根据 NaCl 浓度梯度洗脱的位置及收集的体积,参照文献[5],三种培养液的主要成分可能是:A 液含硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(heparin sulfate proteoglycan, HSPG)、硫酸皮肤素蛋白聚糖(dermatan sulfate proteoglycan, DSPG)和硫酸软骨素—硫酸皮肤素蛋白聚糖(chondroitin sulfate-dermatan sulfate proteoglycan, CS-DSPG);B 液只含 HSPG(因收集的体积少于 A 液,所以 HSPG 浓度为 A 液的 1.75 倍);C 液含 DSPG 和 CS-DSPG。

### 2.2 三种条件培养液对培养的人胎儿主动脉平滑肌细胞增殖的影响

**2.2.1 细胞计数实验结果** 三种条件培养液影响 hASMC 增殖的细胞计数结果见 Table 1。发现 A 液、B 液和 C 液均能抑制 hASMC 增殖,其中以含较高浓度 HSPG 的 B 液抑制作用最强(25.4%),A 液次之(18.2%),不含 HSPG 的 C 液几乎无抑制作用(3.6%)。

**2.2.2 <sup>3</sup>H-TdR 掺入法实验结果** 从 Table 2 可见与细胞计数法实验结果基本一致。

**2.2.3 培养时间对抑制增殖作用的影响** 结果见 Figure,可见人脐静脉内皮细胞条件培养液抑制人胎儿主动脉平滑肌细胞增殖的作用与培养时间无关。

**Table 1. Effect of human umbilical vein endothelial cells-conditioned medium (hUVEC-CM) on cultured human aortic smooth muscle cells proliferating. I. Experimental result of cell count( $\bar{x} \pm s$ ).**

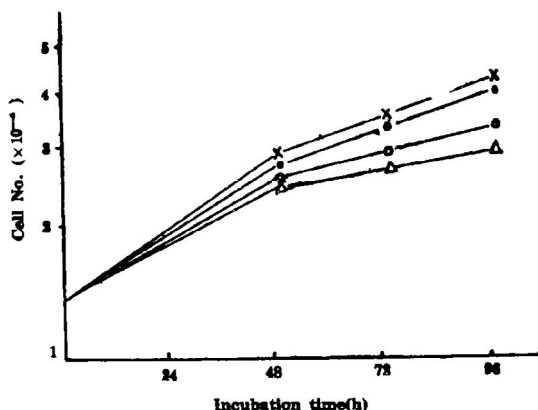
group	n	cell number	inhibiting rate(%)
control	3	28 889 $\pm$ 482	-
A	3	26 111 $\pm$ 482*	18.2
B	3	25 000 $\pm$ 833*	25.4
C	3	28 333 $\pm$ 834	3.6

\*  $P < 0.01$ , compared with control group. control group: regular medium, A group: hUVEC-CM with HSPG, DSPG and CSDSPG; B group: hUVEC-CM with HSPG; C group: hUVEC-CM with DSPG and CSDSPG (the same below).

**Table 2. Effect of human umbilical vein endothelial cells-conditioned medium (hUVEC-CM) on cultured human aortic smooth muscle cells proliferation. I. Experimental result of  $^3\text{H}$ -TdR in corporation( $\bar{x} \pm s$ ).**

Group	n	$^3\text{H}$ -TdR(cpm)	inhibiting rate(%)
control	6	4652 $\pm$ 353	-
A	6	3644 $\pm$ 288*	21.7
B	6	3427 $\pm$ 285*	26.3
C	6	4366 $\pm$ 76	6.2

\*  $P < 0.01$ , compared with control group.



**Figure . Effect of hUVEC-CM on cultured hASMC growth. x x: control, o-o: A, Δ-Δ: B, •-•: C.**

### 3 讨论

培养的 hUVEC 至少合成及分泌三种蛋白聚糖 (proteoglycan, PG)<sup>[4]</sup>, 即 HSPG、DSPG

的 50%。体外实验发现人主动脉正常区的 HSPG 能抑制培养的胎儿主动脉平滑肌细胞增殖<sup>[7]</sup>。本实验发现培养的汇合后 hUVEC-CM 经 DEAE-Sephacel 柱分离得到的三种洗脱液对培养的 hASMC 均有抑制作用, 含高浓度 HSPG 的 B 液抑制作用最强, 而仅含 DSPG 及 CS-DSPG 的 C 液抑制作用最弱。Castellot 等<sup>[3]</sup>发现汇合后的牛动脉内皮细胞培养液能抑制培养的大鼠动脉 SMC 增殖, 其抑制率高于本实验的结果。这可能由于不同种属的 EC 及 SMC 不同而结果各异。有文献<sup>[3]</sup>报道汇合后的 EC 条件培养液对 SMC 的抑制作用有物种特异性。使用对肝素及硫酸乙酰肝素(HS)特异的黄素菌肝素酶(flavobacterium heparinase)处理汇合的牛 EC 培养液后, 其抑制鼠 SMC 增殖的百分率明显降低, 仅为原来的 13%<sup>[8]</sup>, 说明汇合后 EC 培养液对 SMC 有抑制作用的物质主要为 HSPG。HSPG 是内皮细胞膜结合的主要 PG, 当内皮损伤时, SMC 增殖, HSPG 水平明显下降。这些结果都指出内皮细胞合成及分泌的 HSPG 对调节 SMC 的增殖及维持其静止状态有非常重要的生理作用。

本研究还发现 C 液(DSPG+CS-DSPG)对培养 hASMC 增殖也有一定的抑制作用, 可能其中混有极少量 HSPG, 另外 DSPG 对 SMC 也有弱的抑制作用。

Nugent 等<sup>[9]</sup>报道肝素抑制碱性纤维母细胞生长因子与血管 SMC 结合而抑制后者增殖, 但其确切的机制有待探讨。

本试验及以往的研究结果<sup>[7]</sup>均表明 HSPG 抑制 hASMC 增殖, 提示 HSPG 可能对临床防止血管再狭窄的应用研究提供美好前景。

### 参考文献

- 1 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801~809.
- 2 Eisenstein R, Schumacher B, Matijevitch B. Intrinsic regulators of arterial cell growth. *Fed Proc*, 1979, **38**: 1 075 (Abstract).
- 3 Castellot JJ, Addonizio M, Rosenberg R, et al. Cultured endothelial cell produce a heparinlike inhibitor of

- tured endothelial cell produce a heparinlike inhibitor of smooth muscle cell growth. *J Cell Biol*, 1981, **90**: 372~379.
- 4 杨小平, 陈国芬, 张英珊. 人脐静脉内皮细胞培养及形态观察. *中华心血管病杂志*, 1983, **16**: 298~300.
- 5 杨小平, 张英珊, 陈国芬. 培养的人脐静脉内皮细胞合成的蛋白聚糖. *生物化学杂志*, 1988, **5**: 392~398.
- 6 Nermecek CM, Ciughlin SR, Handley DH, et al. Stimulation of aortic smooth muscle cell mitogenesis by serotonin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**: 674~678.
- 7 张春玲, 丛祥凤, 张英珊, 等. 人主动壁硫酸乙酰肝素蛋白聚糖对培养的人主动脉平滑肌细胞生长的影响. *生物化学杂志*, 1996, **2**: 191~194.
- 8 Castellot JJ, Favreau LV, Karnovsky MJ, et al. Inhibition of smooth muscle cell growth by endothelial, cell-derived heparan possible role of a platelet endoglycosidase. *J Biol Chem*, 1982, **357**: 11 256~260.
- 9 Nugent MA, Karnovsky MJ, Edelman ER. Vascular cell-derived HSPG coupled inhibition of bFGF binding and mitogenesis in vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1993, **73**: 1 051~060.
- (1996-06-03 修到, 1996-08-27 修回)