

· 论 著 ·

血小板衍生生长因子-BB对血管内皮细胞、平滑肌细胞及成纤维细胞胶原蛋白合成的影响

任雨笙*, 黄佐, 潘晓明, 杜荣增, 顾兴建, 吴宗贵

(第二军医大学长征医院心血管内科, 上海 200003)

[摘要] **目的:**观察血小板衍生生长因子-BB对培养的人血管内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞胶原蛋白合成的影响。**方法:**采用培养的人血管内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞,应用³H-脯氨酸掺入方法,观察血小板衍生生长因子-BB对3种细胞胶原蛋白合成的影响。**结果:**血小板衍生生长因子-BB可促进处于静止状态的成纤维细胞和平滑肌细胞胶原蛋白合成,并呈现出明显的浓度依赖关系,成纤维细胞和平滑肌细胞胶原蛋白合成分别在30 ng/ml和40 ng/ml时达到高峰,血小板衍生生长因子-BB对血管内皮细胞胶原蛋白合成总量无明显促进作用。在30 ng/ml的血小板衍生生长因子-BB作用下,成纤维细胞和平滑肌细胞分别在36 h和48 h时胶原蛋白合成达到高峰。**结论:**血小板衍生生长因子-BB可明显促进培养的人血管平滑肌细胞和成纤维细胞的胶原蛋白的合成,对血管内皮细胞胶原蛋白合成总量无明显促进作用。

[关键词] 血小板衍生生长因子-BB; 内皮细胞; 平滑肌细胞; 成纤维细胞; 胶原

[中图分类号] R 331 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)02-0167-03

Effects of platelet-derived growth factor BB on collagen synthesis in human vascular endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts

REN Yu-sheng¹, HUANG Zuo, PAN Xiao-ming, DU Rong-zeng, GU Xing-jian, WU Zong-gui (Department of Cardiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the effects of platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) on collagen synthesis in human vascular endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts. **Methods:** The human vascular endothelial cells, smooth muscle cells and fibroblasts were cultured and the effects of PDGF-BB on collagen synthesis in the 3 kinds cells were observed by using ³H-proline incorporation *in vitro*. **Results:** PDGF-BB significantly promoted collagen synthesis in quiescent human smooth muscle cells and fibroblasts in a dose-dependent manner, with the peak synthesis in fibroblasts at 30 ng/ml and in smooth muscle cells at 40 ng/ml; when PDGF-BB was at 30 ng/ml, the peak synthesis in smooth muscle cells and fibroblasts were at 36 h and 48 h, respectively. PDGF-BB showed no effect on collagen synthesis in human vascular endothelial cells. **Conclusion:** PDGF-BB can promote collagen synthesis in cultured human smooth muscle cells and fibroblasts, but has no effect on collagen synthesis in human vascular endothelial cells.

[KEY WORDS] platelet-derived growth factor BB; endothelial cells; smooth muscle cells; fibroblasts; collagen

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(2): 167-169]

血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)有 PDGF-AA、PDGF-BB 和 PDGF-AB 等几种组成形式,是体内一种较强的促有丝分裂剂和化学诱导剂,可刺激组织细胞的分裂、增殖,与机体组织的生长发育、创伤愈合、动脉粥样硬化以及肿瘤的发生、发展有密切的关系^[1,2]。本实验采用培养的人脐静脉血管内皮细胞(umbilical vein endothelial cells, UVEC)、动脉血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)和血管成纤维细胞(vascular fibroblast, VFB),应用³H-脯氨酸掺入的方法,观察 PDGF-BB 对 UVEC、VSMC 和 VFB 胶原蛋白合成的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器 PDGF-BB (Sigma)。Dulbecco's 改良的 Eagle 培养液(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM, Gibco)。胎牛血清(FBS, 杭州四季青生物制品厂)。³H-脯氨酸(中国科学院上海原子能研究所)。胰蛋白酶(Gibco 进口分装)。YJ-875 超净工作台(苏州市净化设备公司)。

[基金项目] 上海市科技发展基金(014119072);上海市自然科学基金(03ZR14029)。

[作者简介] 任雨笙(1963-),男(汉族),博士,副教授、副主任医师,硕士生导师。

* Corresponding author. E-mail: ys-ren@citiz.net

LS6500 型液体闪烁计数仪(Beckman)。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 实验方法

1.2.1 细胞培养 在无菌条件下,取健康新生儿脐带,胰蛋白酶消化法收集 UVEC,待 UVEC 长成致密的呈典型铺路石样的细胞层时,可进行传代培养,传至第 3~8 代时用于实验。在无菌条件下,取人肠系膜下动脉,采用组织贴块法行中层 VSMC 和组织外膜 VFB 培养,时差法除去杂细胞;待 VSMC 长成峰、谷交错的致密细胞层后,VFB 长成梭型束状细胞层后,进行传代培养,传至第 3~8 代用于实验。采用 VIII 因子染色及电镜观察进行细胞学鉴定。

1.2.2 细胞接种 用 10%FBS-DMEM 分别将 UVEC、VSMC 和 VFB 调整细胞数为 2.5×10^4 个/ml,接种于 96 孔培养板,每孔加入细胞悬液 200 μ l,放入 CO₂ 培养箱中孵育 24 h,镜下观察细胞贴壁生长。

1.2.3 ³H-脯氨酸掺入法检测细胞胶原蛋白的合成 将贴壁生长的 UVEC、VSMC 和 VFB 弃去原培养液,用 DMEM 培养液洗涤细胞 3 次,换用含 0.5% 灭活 FBS-DMEM 培养液继续培养细胞 24 h,使细胞同步于 G₀/G₁ 期^[3];加入含 1% 灭活 FBS-DMEM 培养液继续培养 24 h。其中 UVEC 的培养液中加入牛脑垂体提取物 0.05 ng/ml 和表皮生长因子 25 pg/ml。浓度效应组加入 1% 灭活 FBS-DMEM 培养液,同时加入不同浓度的 PDGF-BB(1、10、20、30、40 ng/ml),培养 24 h。时间效应组加入含 30 ng/ml PDGF-BB 的 1% 灭活 FBS 的 DMEM 培养液,分别培养 12、24、36、48 h。以含 1% 灭活 FBS 的 DMEM 培养液作为空白对照组。每种浓度和时间点作 3 个复孔。于培养结束前 6 h 分别加入 1.85×10^4 Bq/孔的³H-脯氨酸继续孵育细胞。培养结束后用多头细胞收集仪将细胞收集于玻璃纤维纸上,在 LS6500 型液体闪烁计数仪上进行放射性强度测定。

1.3 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 软件包对数据进行 t 检验、方差分析等处理。

2 结果

UVEC 随着 PDGF-BB 浓度的增加,胶原蛋白的合成也略有增加,但各浓度组与对照组相比无明显差别($P > 0.05$),提示 PDGF-BB 对 UVEC 胶原

蛋白合成总量无明显促进作用。VSMC 和 VFB 的³H-脯氨酸的掺入值随着 PDGF-BB 浓度增加逐渐增加,呈现出显著的浓度依赖关系。VFB 的胶原蛋白合成在 PDGF-BB 为 30 ng/ml 时达到高峰,VSMC 的³H-脯氨酸掺入值随着 PDGF-BB 浓度的增加而不断升高(图 1)。

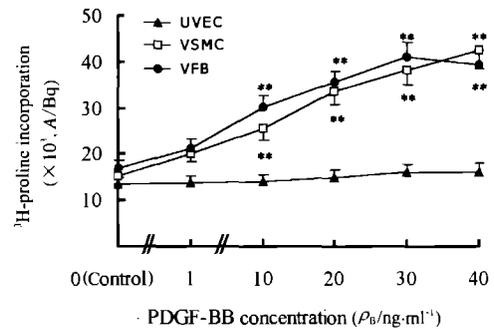


图 1 PDGF-BB 对 UVEC、VSMC 和 VFB 胶原蛋白合成的影响

Fig 1 Effects of PDGF-BB on UVEC, VSMC and VFB collagen synthesis

n=3; ** P<0.01 vs control

观察 30 ng/ml 的 PDGF-BB 对 VSMC 和 VFB 在不同时间点的³H-脯氨酸掺入值的变化发现,对照组随着时间的延长,两种细胞³H-脯氨酸的掺入值有增多的趋势,但 24、36 和 48 h 时其胶原蛋白合成的数值无显著差别($P > 0.05$)。30 ng/ml 的 PDGF 可明显促进 VSMC 和 VFB 的胶原蛋白的合成,VFB 和 VSMC 分别在 36 h 和 48 h 时胶原蛋白合成达到高峰(表 1)。

3 讨论

血管壁是由血管内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞及结缔组织构成,随着血管生物学的深入,血管不再被认为仅是血液的通道,而被证明是一种具有复杂功能的器官。动脉粥样硬化的发生主要是由于血管内皮细胞受损、脱落及功能障碍,血小板附着于受损处并释放 PDGF 及其他生物因子,引起平滑肌细胞由血管中膜向内膜迁移和增殖,同时血管结构细胞合成如胶原等基质,使结缔组织大分子形成以及脂质在细胞内外的沉积和泡沫细胞形成。

PDGF 是一种具有很强组织细胞再生刺激作用的肽类调节因子,在细胞的增殖和转化、组织损伤的修复以及动脉粥样硬化的形成中均起重要的作用。本实验采用细胞培养的方法,除去在体内情况下神经、体液及代谢等方面的影响,以³H-脯氨酸标记掺

表 1 PDGF-BB 对 VSMC 和 VFB 胶原蛋白合成的时间效应

Tab 1 Effects of PDGF-BB on VSMC and VFB collagen synthesis at different time points

Time(t/h)	VSMC ³ H-proline incorporation		VFB ³ H-proline incorporation	
	Control	PDGF-BB	Control	PDGF-BB
12	13.12±1.52	16.81±21.27	15.30±1.62	20.56±2.31
24	15.31±1.83	38.11±3.12**	16.97±1.76	41.10±3.13**
36	16.35±1.76	50.74±4.32**	20.21±2.13	60.55±5.62**
48	17.17±2.03	53.04±4.36**	18.15±1.93	57.39±5.32**

** P<0.01 vs control; PDGF-BB: 30 ng/ml

入 UVEC、VSMC 和 VFB, 观察 PDGF-BB 对上述 3 种细胞胶原蛋白合成的影响。为了较精确的观察 UVEC、VSMC 和 VFB 胶原蛋白合成的情况, 实验在加入 PDGF-BB 前, 用 0.5% 灭活 FBS-DMEM 培养细胞 24 h, 使细胞生长周期同步于 G₀/G₁ 期^[3]。实验结果显示, PDGF-BB 可明显促进 VSMC 和 VFB 的胶原合成, 呈现出一种浓度效应关系, 而对 UVEC 的胶原合成总量无明显的促进作用。

细胞外基质对维持组织、细胞的结构和正常功能有着十分重要的作用。PDGF 可特异性地调节成纤维细胞胶原的合成^[4], 可刺激纤维细胞合成 V 型胶原, 并调节 III 型胶原的合成。我们的其他研究^[5,6]证实血管内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞均为 PDGF 的靶细胞, 其细胞膜上存在 PDGF 的受体, PDGF 可促进上述 3 种细胞的增殖, 并有明显的量效依赖关系及不同的反应时间性, PDGF 同时可促使 VSMC 细胞内 CaM 含量的增加进而促进 VSMC 的收缩^[7]。在动脉粥样硬化形成过程中多种细胞因子和生长因子参与了调控, 而 PDGF 是其中十分重要的因子之一。动脉粥样硬化斑块形成中除了平滑肌细胞迁移和增殖以及脂质沉积外, 还有结缔组织大分子, 包括胶原的大量形成。PDGF 可促进平滑肌细胞和成纤维细胞胶原的合成, 这可能对于促进新生血管的形成、血管组织重构及动脉粥样硬化等的形成具有重要的意义; PDGF 可促进包括胶原在内的细胞外基质的合成, 可能对保持血管斑块稳定性具有潜在性意义。

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 VI 型胶原外的另外 5 种胶原^[8,9]。本实验发现 PDGF-BB 对 UVEC 的胶原合成无明显的促进作用, 可能有以下一些原因: (1) UVEC 种属间的差异, 其培养的条件要求较高, 培养时需要加入牛脑垂体提取物和表皮生长因子, 与另外两种细胞的培养条件略有不同, 在低营养供应的情况下蛋白质和胶原的合成可能受到限制; (2) 胶原合成的时间和数量上可能有所不同, 培养的

内皮细胞在贴壁时要分泌一层基质物质以利细胞的附着, 而细胞单层融合后, 生长即停止; (3) 可能与其他生物因子的作用有关; (4) 30 ng/ml 的 PDGF-BB 对 UVEC 胶原合成总量无明显影响, 如采用更高浓度的 PDGF-BB 或延长细胞培养时间, 是否会有其他的结果, 目前尚不清楚。本实验未对 3 种血管组织细胞分泌的胶原进行定性分析, 这是需要将来进一步研究和探讨的问题, 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] Doanes AM, Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ, et al. A requirement for rac1 in the PDGF-stimulated migration of fibroblasts and vascular smooth cells[J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1998, 45(2):279-287.
- [2] Inoue K, Cynshi O, Kawabe Y, et al. Effect of BO-653 and probucol on c-MYC and PDGF-A messenger RNA of the iliac artery after balloon denudation in cholesterol-fed rabbits[J]. *Atherosclerosis*, 2002, 161(2):353-363.
- [3] Kuga T, Kobayashi S, Hirakawa Y, et al. Cell cycle-dependent expression of L- and T-type Ca²⁺ currents in rat aortic smooth muscle cells in primary culture[J]. *Circ Res*, 1996, 79(1):14-19.
- [4] Dubey RK, Gillespie DG, Zacharia LC, et al. A2b receptors mediate the antimitogenic effects of adenosine in cardiac fibroblasts[J]. *Hypertension*, 2001, 37(2 Pt 2):716-721.
- [5] 任雨笙, 陈强, 贾国良, 等. 血小板衍生生长因子 β 受体在人冠状动脉组织中的表达[J]. 第四军医大学学报, 1998, 19(6):652-654.
- [6] 任雨笙, 杜荣增, 崔芳, 等. 血小板衍生生长因子-BB 对血管内皮细胞、平滑肌细胞及成纤维细胞增殖的影响[J]. 高血压杂志, 2003, 11(3):219-222.
- [7] 任雨笙, 杜荣增, 黄佐, 等. 血小板衍生生长因子诱导人血管平滑肌细胞增殖时钙调素的变化[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(6):620-622.
- [8] Batnes MJ. Collagen in atherosclerosis[J]. *Collagen Rel Res*, 1985, 5(1):65-69.
- [9] Kossi J, Muona P, Tuukkanen J, et al. Effects of glucose on collagen mRNA levels and collagen secretion in EAhy 926 endothelial cell line[J]. *Ann Chir Gynaecol*, 2001, 90 (Suppl 215):39-44.

[收稿日期] 2004-06-08

[修回日期] 2004-09-22

[本文编辑] 李丹阳