

平滑肌细胞源性趋化因子的研究*

同济医科大学 邓仲端 瞿智玲

摘要 以免主动脉平滑肌细胞条件培养基作为趋化因子的来源,用微孔滤膜法检测其对平滑肌细胞及 NIH 3T3 纤维母细胞的趋化活性。结果表明,该条件培养基对培养的平滑肌细胞有明显的趋化活性,而对 NIH 3T3 纤维母细胞则否;该条件培养基对平滑肌细胞的迁移作用是一种趋化作用而非化学促进作用。

关键词 趋化因子; 平滑肌细胞; 动脉粥样硬化

已知血液单核细胞迁入动脉内膜是动脉粥样硬化早期病变之一。进入内皮下间隙的单核细胞被激活,分化成为巨噬细胞,并摄取脂质,成为泡沫细胞,病变发展为脂纹。其后,中膜平滑肌细胞(SMC)迁入内皮下间隙,增生并合成胶原,使病变成为纤维斑块^①。内皮细胞、单核细胞及 SMC 通过合成和分泌细胞因子而互相作用。我们曾报道培养的内皮细胞、SMC 产生单核细胞趋化因子及腹腔巨噬细胞产生的趋化因子^{②~④}。本实验以平滑肌细胞条件培养基(SMC-CM)作为趋化因子的来源,检测其对 SMC 及 NIH 3T3 细胞的趋化活性,以期了解其趋化活性的细胞特异性。

1 材料和方法

1.1 兔平滑肌细胞培养及条件培养基的制备

选用 4~6 周龄的日本大耳白兔,主动脉 SMC 原代培养用组织贴块法,置于 37℃ 5%CO₂ 培养箱,进行培养。待细胞生长融合,出现“峰与谷”结构后进行传代(图 1)。培养液用含 10%胎牛血清的 M₁₉₉(美国 Gibco 公司产品)。

条件培养基的制备:待 SMC 传至第 4 代,移去原培养液,D-Hanks 缓冲液洗涤 2 次,加入无血清培养基(DME/F12 混合培养基, Sigma 公司),继续培养 48 小时,吸出培养液,即为 SMC-CM,过滤除菌, -20℃ 保存待用。

用上述无血清培养基作为非条件培养基(uM)作对照试验。

1.2 用于迁移试验细胞的收集

1.2.1 平滑肌细胞

选择生长良好的第 3 代和第 4 代 SMC 用于迁移试验。用 0.1%胰蛋白酶消化,加含 10%小牛血清的 M₁₉₉ 终止反应,用滴管将细胞吹打下来。离心, 1000r/min, 10 分钟。弃去上清液。加适量 D-Hanks 液,调细胞浓度至 $0.5 \times 10^6/\text{ml} \sim 1 \times 10^6$ 个/ml。按实验分组所需细胞数分两份分别离心,弃去上清液,分别用 SMC-CM 及 uM 制成细胞悬液。台盼蓝拒染试验, SMC 的存活率在 90% 以上。

1.2.2 NIH 3T3 纤维母细胞

所用 NIH 3T3 纤维母细胞系由武汉大学菌种保存中心提供,传代培养用含 10%小牛血清的 M₁₉₉ 培养基,这种细胞生长繁殖较快,待细胞数足够后,用上述方法消化收集细胞,进行迁移试验。

1.3 迁移试验

用改良的 Boyden 小室进行^[5]。下室加满各种实验液,上下室之间隔以硝酸纤维素微孔滤膜,上室为 uM 或 SMC-CM 的细胞悬液。将小室置于 37℃, 5%CO₂ 培养箱中温育(SMC 温育 8h, NIH 3T3 细胞 16h)。取出滤膜,依次放入染色架铜网之间,用纯正丙醇固定, Harris 苏木素染色。

迁移距离的检测:在高倍镜(目镜×10,物镜×40)下,用微调旋钮调焦距对准滤膜表面(可见膜结构和大量 SMC 或 NIH 3T3 细胞)作为起点。转动旋钮,可见细胞数逐渐减少,直至只剩下 2~3 个细胞时即为移动的终点(图 2~4)。从微调旋钮的刻度上读出起点至终点的微米数,即为细胞移动距

* 本文为国家八五科技攻关项目

离。每组各两张膜,每膜随机取5个视野读数。SMC和NIH 3T3细胞迁移试验分别重复4次和3次,分别得出40及30个数据,算出平均值及标准误。统计学方法用两两比较秩和检验和T检验。

迁移实验分组:共分4组。上室的细胞悬液除化学促动组外,其余3组均用非条件培养基制成细胞悬液。(1)随机移动组:即阴性对照组,下室为非条件培养基,不含趋化因子,检测SMC的随机移

动。(2)阳性对照组:下室加满兔活化血清,含C₃,对细胞有很强的趋化活性^②。(3)趋化运动组:下室加满SMC-CM,以观测其对上述细胞的趋化活性。(4)化学促动组:上下室均加SMC-CM,以检测上下室不存在趋化因子的浓度梯度时细胞的移动,即观察SMC-CM对SMC及NIH 3T3细胞随机移动的影响(表1)。

Table 1 dividing into groups of migration experiment

groups	cellular suspension of up-chamber	experiment liquid of down-chamber
group of random migration	non-condition	non-condition
group of positive control	non-condition	activated serum
tactic movement group	non-condition	SMC-CM
chemoattractant group	SMC-CM	SMC-CM

Table 2 SMC mean movement distance induced by SMC-CM ($\bar{x} \pm S\bar{x}$)

groups	n	random movement group	positive control group	tactic movement group	chemoattractant group
mean movement distance	40	31.95 \pm 1.93	51.98 \pm 3.07	47.75 \pm 3.36	29.3 \pm 1.31

2 结果

2.1 平滑肌细胞的迁移

SMC迁移试验各组的移动距离见表2。

从表2所示,阳性对照组和趋化运动组的SMC迁移距离均明显大于随机移动组和化学促动组,经统计学处理,差异有极显著性意义($P < 0.01$)。而阳性对照组与趋化运动组,随机移动组与化学促动组相比,差异无显著性意义($P > 0.05$)。

2.2 NIH 3T₃ 纤维母细胞的迁移

NIH 3T₃细胞迁移试验各组的移动距离见表3。

Table 3 NIH 3T₃ mean movement distance induced by SMC-CM

groups	n	random movement group	positive control group	tactic movement group	chemoattractant group
mean movement distance ($\bar{x} \pm s$)	30	44.0 \pm 4.38	72.8 \pm 6.72	39.3 \pm 10.77	36.9 \pm 5.88

从表3可见,随机移动组、趋化运动组及化学促动组的平均移动距离均明显小于阳性对照组,经统计学处理,差异有显著性意义($P < 0.05$)。而且,趋化运动组的平均移动距离也小于随机移动组,差

异有显著性意义($P < 0.05$)。

3 讨论

从本实验的结果看,在阳性对照组中,兔活化

血清对 SMC 有很强的趋化活性,说明本试验的可靠性。趋化运动组 SMC 的移动距离明显大于随机移动组,说明 SMC-CM 中存在趋化因子,招引 SMC 定向移动,而化学促动组,即上下室均加 SMC-CM,不存在趋化因子的浓度梯度时,则 SMC 的移动距离与随机移动组无显著性统计学差异。由此可见,SMC-CM 所致的 SMC 迁移是一种趋化作用(chemotaxis),而不是化学促动作用(chemokinesis)。

我们过去的研究表明,培养的正常兔主动脉 SMC 及动脉粥样硬化兔 SMC 均可产生趋化因子,引起单核细胞迁移,并证明这种因子可能是一种蛋白质^[3,4]。本次实验表明,正常兔主动脉 SMC-CM 亦可引起 SMC 迁移,说明 SMC 也有这种趋化因子的受体,提示 SMC-CM 无细胞特异性,或其中含有一种以上的趋化因子。然而,本实验结果表明,SMC-CM 不引起 NIH 3T3 细胞迁移,其原因不明,尚待进一步研究。

近年研究表明,动脉壁内的细胞,包括内皮细胞、SMC 及单核细胞等,通过分泌细胞因子而相互作用,招引血单核细胞及中膜 SMC 迁入内皮下间隙,这是动脉粥样硬化发生的关键机制。Valente (1988)^②从 SMC 条件培养基中纯化得一种 SMC 源性趋化因子,分子量为 14500 道尔顿。现已知为单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)。此种肽由 SMC、内皮细胞产生,可引起单核细胞迁移,但对中性细胞无趋化活性^③。最近,我们实验室通过肝素结合琼脂糖亲和层析法纯化得一种蛋白质,分子量为 23000~26900 道尔顿(另

文发表),这种蛋白质不仅对 NIH 3T3 细胞有增殖活性,而且可引起单核细胞迁移,此蛋白质与 MCP-1 的关系尚未明了。

参 考 文 献

1. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA. A modern view of atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1993;71(6): 9B
2. 阮秋容,邓仲端,徐增绶,等. 培养的人脐静脉内皮细胞产生单核细胞趋化因子的研究. *中华病理学杂志* 1991;20(3): 205
3. 朱阎宏,邓仲端,徐增绶,等. 兔主动脉平滑肌细胞培养产生单核细胞趋化因子的观察. *中华医学杂志* 1991;71(9): 506
4. 朱阎宏,王珩,邓仲端,等. 培养的动脉粥样硬化兔动脉平滑肌细胞产生单核细胞趋化因子. *中国循环杂志* 1991;6(3): 216
5. 邓仲端,邱红明,瞿智玲,等. 巨噬细胞源性趋化因子所致的平滑肌细胞迁移. *中华病理学杂志* 1993;22(3): 163
6. 朱阎宏,邓仲端. 兔血单核细胞的分离方法. *中国病理生理杂志* 1992;8(4): 405
7. Valente AJ, Graves DT, Viall-Valentin CE, et al. purification of a monocyte chemotactic factor (SMC-CF) secreted by non-human primate vascular smooth muscle cells in culture. *Biochemistry* 1988;27(11): 4162
8. Cushing SD, Berliner JA, valente AJ, et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(13): 5134

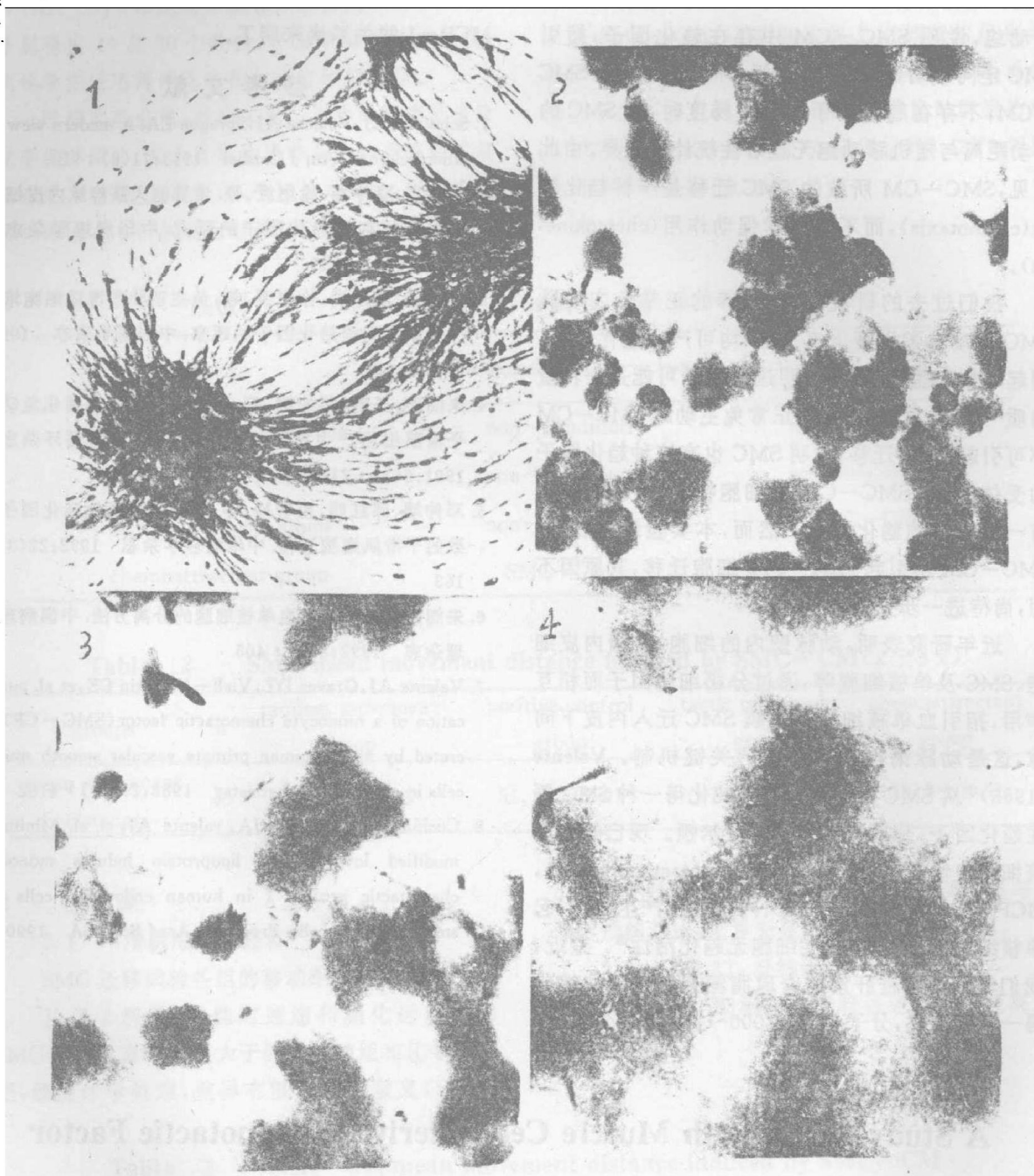
A Study On Smooth Muscle Cell-derived Chemotactic Factor

Deng Zhongduan, Qu Zhiling

Department of Pathology, Tongji Medical University, Wuhan, 430030

The medium conditioned by cultured rabbit aortic smooth muscle cells (SMC-CM) was used as the source of chemotactic factor. Its chemotactic activity for smooth muscle cells (SMCs) and NIH 3T3 fibroblasts were examined by microporous filter assay. The results showed that the SMC-CM was chemotactic for SMCs but not for NIH3T3 fibroblasts, and the effects of SMC-CM on SMC migration were considered to be chemotactic rather than chemokinetic in nature.

Key Words Chemotactic factors; smooth muscle cells; cultured cells; atherosclerosis



Figs Study of chemo tactic factors derived from smooth muscle cells

Fig1 The fourth generation of smooth muscle cells showing structure of "peak or valley". Hematoxylin—eosin $\times 46$

Fig2 The smooth muscle cytoplasm on surface of filter being spacious and projecting. Hematoxylin $\times 455$

Fig3 SMC migrated to middle segment forming a lot of irregular projects. Hematoxylin $\times 455$

Fig4 SMC migrated to terminal point showing some irregular projects $\times 455$