

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2000)-03-0206-03

不同切应力下的内皮细胞条件培养基对平滑肌细胞增殖和胶原合成的影响

韩林, 张宝仁, 覃开荣¹, 朱家麟, 柳兆荣¹

(第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433; 1. 复旦大学应用力学系)

[关键词] 内皮细胞; 切应力; 肌, 平滑; 胶原合成; 血管重建; 平行平板流动腔

[摘要] 为研究不同切应力下内皮细胞条件培养基对平滑肌细胞和胶原合成的影响, 建立平行平板流动腔模型, 模拟产生定常层流, 采用³H-胸腺嘧啶核苷掺入法和胃蛋白酶消化法, 测定细胞DNA和胶原合成量。实验发现, 与单用10%牛血清DMEM培养基比较, 静态培养的内皮细胞条件培养基促使平滑肌细胞DNA和胶原合成, ³H-胸腺嘧啶核苷掺入量从 749 ± 53 cpm/ 10^3 细胞上升至 $1\,202 \pm 63$ cpm/ 10^3 ($P < 0.01$), 平滑肌细胞掺入2, 3-³H-羟脯氨酸量从 30 ± 6 cpm/ 10^3 细胞上升至 47 ± 4 cpm/ 10^3 细胞 ($P < 0.01$)。内皮细胞在10和25 dyn/cm²切应力剪切18 h后, 内皮细胞条件培养基对平滑肌细胞DNA和胶原合成促进效应分别下降了10.41% \pm 5.66%、23.97% \pm 6.23%和45.71% \pm 2.93%、64.53% \pm 2.42%。由此提示内皮细胞所受血流切应力减小后, 其条件培养基能促使平滑肌细胞的增殖和胶原合成。

[中图分类号] R331.32

[文献标识码] A

Effect of Supernatant of Endothelial Cells Exposed to Laminar Flow on Small Muscle Cells Proliferation and Collagen Synthesis

HAN Lin, ZHANG Bao-Ren, Qin Kai-Rong, ZHU Jia-Lin, and LIU Zao-Rong

(Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

MeSH Endothelial; Shear Stress; Muscle, Smooth; Collagen Synthesis; Vessel Wall Remodeling; Parallel Plated Flow Chamber

ABSTRACT **Aim** To establish whether the changes of local blood flow involved in the vessel wall remodeling, we investigated the effects of culture medium conditioned with endothelial cells exposed to hemodynamic shear forces on modulation of smooth muscle cells (SMC) proliferation and collagen synthesis. **Methods** SMC were isolated and cultured with collagenase digestion. Confluent monolayers of EC were exposed to static or to laminar flow conditions for 24 h using a parallel-plated flow chamber. Endothelial cell-conditioned medium was used to study the growth of PASMC by ³H-thymidine uptake and collagen synthesis of PASMC using 2, 3-³H-proline incorporation into ³H-hydroxyproline. **Results** The proliferative response of SMC to culture medium from endothelial cells under static flow is higher than to fresh medium ($1\,202 \pm 63$ cpm/ 10^3 cells vs. 749 ± 53 cpm/ 10^3 cells, $P < 0.01$). SMC synthesized more collagen cultured with medium from endothelial cells under static flow than fresh medium (47 ± 4 cpm/ 10^3 cells vs. 30 ± 6 cpm/ 10^3 cells, $P < 0.01$). In contrast, medium conditioned with endothelial cells exposed to shear stress of 10 dyn/cm² and 25 dyn/cm² after 18 h reduced SMC DNA and collagen synthesis by 10.41% \pm 5.66%, 23.97% \pm 6.23% and 45.71% \pm 2.93%, 64.53% \pm 2.42% comparison with medium from endothelial cells under static flow. **Conclusions** Our experimental results showed lower shear stress led to enhance the underlying SMC proliferation and collagen synthesis. It suggests a steady level of shear stress acting on artery plays an important role of preventing it of remodeling.

[基金项目] 国家自然科学基金资助(19702002)

[作者简介] 韩林, 男, 1968年生, 浙江宁波人, 胸心外科学博士, 从事胸心外科专业, 擅长于风湿性心脏病肺动脉高压形成机制的研究和临床治疗。张宝仁, 男, 1933年生, 河南开封人, 主任医师, 教授, 博士生导师, 从事胸心外科专业, 擅长于风湿性心脏病发病机制的研究和外科治疗, 曾多次获国家和军队科技进步奖。

在机体循环系统中, 血液流动对血管表面产生的切应力不仅影响内皮细胞的形态, 而且调控内皮细胞内生物活性物质的基因表达, 其在维持正常血管生理和参与多种心血管疾病发生发展中的意义日益受到重视^[1,2]。本实验通过体外培养内皮细胞 (endothelial cell, EC) 和平滑肌细胞 (smooth muscle

cell, SMC), 建立平行平板流动腔模型, 观察在不同大小切应力作用下内皮细胞条件培养基(endothelial cell-conditioned medium, EC-CM) 对平滑肌细胞增殖和胶原合成的影响, 以进一步探讨血流变化对血管构建重组的影响。

1 材料和方法

1.1 内皮细胞的培养和鉴定

用 0.1% 胶原酶(Ⅲ型) 消化法分离培养小牛肺动脉内皮细胞, 相差显微镜下观察细胞形态, 凝血(Ⅱ) 因子相关抗原免疫组织化学检测以鉴定培养的细胞。第 4~7 代细胞用于实验, 内皮细胞接种于 110 mm × 70 mm × 10 mm 玻璃平板, 细胞长满后 2 天用于剪切实验。

1.2 平滑肌细胞的培养和鉴定

用 0.2% 胶原酶(Ⅲ型) 消化法分离培养小牛肺动脉肌条, 根据细胞形态、生长特点及超微结构鉴定培养的细胞。第 5 代细胞用于实验。

1.3 平行平板流动腔的建立和使用

本实验装置由流室、灌流辅助系统、混合气体供应部分和恒温生化培养箱组成。流室是由聚碳酸酯平板附以厚为 0.2 mm 矩形硅胶垫圈, 通过真空吸附铺有培养内皮细胞的玻璃平板组成, 规格 80 mm × 45 mm × 0.2 mm; 灌流辅助系统由上、下两只特制的玻璃贮液瓶、硅胶管和恒流泵组成, 上、下贮液瓶之间的高度差(H) 决定通过流室内的流量(Q), 恒流泵维持灌流液循环, 灌流液为无血清改良 Eagles 培养基(DMEM), 总量为 25 mL; 混合气为 95% 空气+ 5% 二氧化碳。流室内皮细胞所受切应力根据如下公式计算: $\tau = \rho v h / 2L$, 其中 ρ 为灌流液密度, v 为加速度, h 为流室高度, L 为流室腔长度。

流室、灌注管道和贮液槽预先经高压灭菌, 于 37℃ SHH 生化培养箱内无菌条件下进行装配和使用。分别在 10、15 和 25 dyn/cm² 切应力下作用 18 h 后, 收集灌流液, 1 000 g 离心 5 min, 取上清液用于下一步实验。

1.4 平滑肌细胞增殖和胶原合成量的测定

平滑肌细胞以 4×10^4 接种于 6 孔培养皿, 2 天后长成单层融合, 吸弃培养基, 用 Hanks 液轻洗三遍, 用无血清 DMEM 培养基培养 24 h, 各孔换入各组条件培养基 1 mL, 37℃ 培养 24 h, 测试 DNA 合成组加入 ³H- 胸腺嘧啶核苷培养 4 h, 测试胶原合成组加入 2, 3- ³H- 脯氨酸培养 3 h, 收集细胞及培养基, 按文献[3, 4] 介绍的方法测定细胞 DNA 和胶原

的合成量。

1.5 统计学处理

结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用未配对资料的 t 检验。

2 结果

2.1 肺动脉内皮细胞和平滑肌细胞培养和鉴定

光镜下见培养的内皮细胞呈多角形, 单层生长达到融合后, 呈鹅卵石样排列; 凝血(Ⅱ) 因子相关抗原(ⅡR: Ag) 检测见内皮细胞核周胞浆呈紫褐色颗粒分布。平滑肌细胞多为长梭形, 稀疏生长时少数可呈多角形, 电镜下见靠近细胞膜处有丰富的致密斑和与细胞长轴平行的肌丝束。

2.2 内皮细胞条件培养基对平滑肌细胞增殖的影响

平滑肌细胞用静息状态内皮细胞条件培养基与用 DMEM 培养基培养 24 h 比较, 前者平滑肌细胞的 ³H- 胸腺嘧啶核苷掺入量明显增加(1 202 ± 63 cpm/10³ 细胞比 749 ± 53 cpm/10³ 细胞, $P < 0.05$)。在静息状态内皮细胞条件培养基培养的 ³H- 胸腺嘧啶核苷掺入量为 100%, 在切应力分别为 10、15 和 25 dyn/cm² 作用后的内皮细胞条件培养液培养的 ³H- 胸腺嘧啶核苷掺入量分别下降了 10% ± 5%、23% ± 7% 和 23% ± 6% ($P < 0.01$)。

2.3 内皮细胞条件培养基对平滑肌细胞合成胶原的影响

平滑肌细胞用静息状态内皮细胞条件培养基与用 DMEM 培养基培养 24 h 比较, 2, 3- ³H- 脯氨酸掺入平滑肌细胞合成 2, 3- ³H- 羟脯氨酸的量明显升高(30 ± 6 cpm/10³ 细胞比 47 ± 4 cpm/10³ 细胞, $P < 0.01$), 细胞分泌入培养基中胶原量也相应升高(2.1 ± 0.5 比 5.3 ± 0.6, $P < 0.01$)。然而平滑肌细胞在剪切作用后的内皮细胞条件培养基培养后, 细胞合成 2, 3- ³H- 羟脯氨酸的量和分泌的胶原量明显受到抑制, 并随切应力的增大而增强(表 1, Table 1)。

3 讨论

内皮细胞和平滑肌细胞是构成血管壁的主要细胞, 前者可合成和分泌多种生物活性因子, 以调节平滑肌细胞的舒缩、增殖和细胞外基质的合成。构成血管壁内膜的内皮细胞始终处于不断流动的血液环境中, 很早以前, 人们提出血流参与调节血管发

表1 切应力对内皮细胞条件培养基促进平滑肌细胞胶原合成效应的抑制作用

Table 1 Effect of culture medium conditioned with endothelial cells exposed to hemodynamic shear forces on modulation of SMC collagen synthesis ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

τ (dyn/cm ²)	Cell(%)	Medium(%)
0	100	100
10	64.29 \pm 2.93 ^a	68.61 \pm 4.95 ^a
15	46.42 \pm 3.58 ^b	52.67 \pm 3.13 ^b
25	35.47 \pm 2.42 ^c	28.11 \pm 2.54 ^c

a: $P < 0.01$, compared with 0 dyn/cm²; b: $P < 0.01$ compared with 10 dyn/cm²; c: $P < 0.01$ compared with 15 dyn/cm².

育和生长的假设, 并认为局部血流环境的紊乱参与许多血管疾病的病理生理过程, 但其机制尚不明确^[1]。本实验研究的切应力是构成血流流动特性的主要因素, 是血液流动作用于血管内膜的摩擦力, 内皮细胞是受力细胞, 在正常生理条件下大血管中内皮所受的切应力为 20~ 25 dyn/cm², 我们采用离体的平行平板流动腔模型研究定常层流作用于内皮细胞的切应力, 实验结果发现, 与静息状态下培养相比较, 定常层流环境下培养的内皮细胞条件培养基抑制平滑肌细胞 DNA 和胶原合成, 并随所受切应力的增大而增强, 由此我们推断血管局部血流速度的减缓参与血管壁的重建。

然而血管局部血流速度增快同样可引起血管壁的重建, 但与前者机制不尽相同, 处于高速血流下的血管, 内皮长期受到侵蚀, 内皮屏障遭到破坏, 弹力蛋白酶激活, 内膜下弹力层分解, 降解产物和血浆内浸入血管壁的促丝裂因子刺激平滑肌细胞增殖, 并向内膜下浸润^[5]。而切应力减小却是通过调节内皮细胞功能引起血管壁的病变, 内皮细胞表面的特殊

感受器能感受切应力的变化, 然后将切应力转化为生物效应, 如离子通道激活、G- 蛋白构形改变、纤粘蛋白受体结构和数目的变化。在细胞内的第二信使, 如 cAMP/ cGMP、PKC、IP3 和 Ca⁺⁺ 等介导下, 细胞浆内的活性酶和结构蛋白磷酸化, 增强或减弱细胞内生物活性因子的基因翻译和转录^[2,6], 当内皮细胞所受切应力减小时, 其分泌的生长因子增多和生长抑制因子减少, 从而引起平滑肌细胞的增殖和胶原合成增强。

研究表明, 在循环血管中保持一定水平的切应力, 使内皮细胞合成生长因子和生长抑制因子趋于动态平衡, 对维持血管壁正常生理结构有重要的意义。

参考文献

- [1] Resnick N. Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression [J]. *FASEB J*, 1995, **9**: 874
- [2] 韩林, 张宝仁, 柳兆荣, 等. 稳态层流下的内皮细胞形态特征变化 [J]. 第二军医大学学报, 1999, **20**: 803
- [3] Nathalie B. Karillon G.I. Merval R. et al. Differential effects of pressure and flow on DNA and protein synthesis and on fibronectin expression by arteries and a novel organ culture system [J]. *Circ Res*, 1995, **77**(2): 684
- [4] 但清宏, 黄元伟, 楼定安. 内皮细胞条件培养基对平滑肌细胞合成胶原的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 1993, **9**: 498
- [5] Musci M. Mechanical stretching of human saphenous vein grafts induces expression and activation of matrix-degrading enzymes associated with vascular tissue injury and repair [J]. *Exp Mol Pathol*, 1999, **66**: 227
- [6] Malek AM. Fluid shear stress differentially modulates expression of genes encoding basic fibroblast growth factors and platelet-derived growth B chain in vascular endothelium [J]. *J Clin Invest*, 1993, **92**: 2 013

(此文 2000- 01- 22 收到, 2000- 07- 10 修回)

(此文编辑 朱雯霞)