

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2001)-02-0126-01

血管内皮细胞生长因子促进培养的血管内皮细胞 胶原Ⅲ型基因 mRNA 的表达(摘要)

曾海涛², 罗迪贤², 曾赛珍², 刘革修¹, 黄红林¹, 廖端芳¹
(南华大学 1. 药理教研室; 2. 临床医学专业 1996 级学生, 衡阳 421001)

[主题词] 血管内皮细胞生长因子; 内皮细胞; 基因表达

[中图分类号] R329.28

[文献标识码] A

1 材料和方法

1.1 内皮细胞培养

取新生儿脐带, 收集内皮细胞。于 37℃5% CO₂ 培养箱内用含 20% 胎牛血清的 M199 培养基培养 (含青霉素 50 ku/L、链霉素 100 mg/L、谷氨酸 2 mmol/L 和 GIBCO BRL)。采用形态及 CD33 免疫组织化学方法鉴定。

1.2 Northern blot 分析

取第 2~4 代内皮细胞, 以 5.0×10^4 个/cm² 接种于 1% 胎牛血清的 M199 培养基中培养 48 h 后, 给予血管内皮细胞生长因子(VEGF) 培养 24 h, 采用异硫氰酸胍酸酚一步法提取总 RNA。紫外分光光度计测定 RNA 浓度。胶原基因 IODN 探针设计为 5'-GGAGCTCCTGGGCCTCAGCC-3'; GAPDH 探针设计为 5'-TGAAGCTCGGAGTCAACGGA-3'。取 15 μg RNA 作变性甲醛电泳, 转印于硝酸纤维素膜, 以鱼精 DNA 做预杂交, 采用 T4 DNA 核苷酸激酶同位素标记反义 ODN 探针做杂交。经 Northern blot 印迹杂交放射自显影后, 采用光密度扫描仪扫描, 得该标本 VEGF mRNA 水平(以 GAPDH 为内对照)。实验重复 3 次, 每次每组设 6 孔。

结果取其均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 组间进行 t 或校正 t' 检验或成组设计方差分析。

2 结果

剂量效应实验显示, 10 μg/L VEGF 可明显促进内皮细胞胶原基因 ivmRNA 的表达增加 197% ($P < 0.01$), 100 μg/L VEGF 作用与之相似, 而 1 μg/L VEGF 作用不明显 ($P > 0.05$)。故后续实验 VEGF 浓度以 10 μg/L 为标准。时间效应实验显示, 10 μg/L VEGF 处理内皮细胞 16 h 后, 内皮细胞胶原基因 iv

mRNA 的表达开始增加 ($P < 0.01$), 24 h 达到高峰, 48 h 后开始下降。

3 讨论

血管内皮细胞功能失调在经皮冠状动脉成形术后再狭窄中起重要作用。内皮细胞功能失调时, 多种生长因子和癌基因异常表达和分泌, 使血管平滑肌细胞表型发生改变, 从成年型(收缩/静止型)向胚胎型(合成/分泌型)转化。只有合成型平滑肌细胞具有较强的分泌功能和增殖特性, 胶原蛋白被证明具有促进平滑肌细胞表型转换和增殖的功能, 说明血管内皮细胞在调节迁移到内膜的平滑肌细胞表型转换和增殖中具有重要作用, 且可能分泌胶原蛋白为其作用的中介物。转 VEGF 基因的血管内皮细胞内皮化试验中发现, 虽可明显防治再狭窄的发生程度, 但仍有较高的狭窄率。而血管内皮细胞有分泌 iv 型胶原蛋白的能力, 由此提示 VEGF 可能通过诱导血管内皮细胞生成过多的胶原蛋白来启动血管中膜平滑肌细胞的表型转换和增殖, 大量分泌细胞外基质, 最终导致血管再狭窄。

我们用 Northern blot 分析发现 VEGF 刺激培养的人脐静脉内皮细胞表达和分泌胶原蛋白 iv 型增多。由此提示在血管再狭窄过程中, 血管内皮化修复损伤内皮的同时, 分泌了一些促进平滑肌细胞表型转换和增殖的物质, 如 iv 型胶原蛋白等。该实验第一次显示 VEGF 在体外能促进内皮细胞表达和分泌胶原蛋白 iv。这为再狭窄的防治提供理论基础, 如以后可以改进血管内皮化的治疗方法, 采用一些方法减少或阻止 iv 型胶原蛋白的合成, 从而减少其副作用, 提高血管内皮化防治再狭窄的效果。

(此文 2000-09-04 收到, 2001-04-02 修回)

(此文编辑 朱雯霞)