

两种细胞因子和表皮生长因子、纤维母细胞生长因子 对血管平滑肌细胞清道夫受体活性的影响

单汴茵 楼定安 张骅 毛峥嵘 魏克荣

(浙江医科大学病理学教研室, 杭州 310031)

Effects of Fibroblast Growth Factor, Epidermal growth Factor, Tumor Necrosis Factor, and Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor on Scavenger Receptor Activity of Vascular Smooth Muscle Cells

SHAN Zhi-Yin, LOU Ding-An, ZHANG Hua, MAO Zheng-Rong and WEI Ke-Rong

(Department of Pathology, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310031, China)

ABSTRACT

Aim To investigate whether basic fibroblast growth factor (bFGF), epidermal growth factor (EGF), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) have effect on the binding of scavenger receptor of vascular smooth muscle cells (VSMC) and oxidized low density lipoprotein (ox-LDL).

Methods Antibody against ox-LDL was prepared using immunizing guinea pig with ox-LDL which was made by means of copper oxidization. Smooth muscle cells were collected from the culture of calf aorta media. The binding activity between scavenger receptor and ox-LDL was analyzed using cell BA-ELSA.

Results The binding activity of scavenger receptor and ox-LDL was $4.8 \pm 4.0 \mu\text{g/L}$. The activity increased 3~3.5 fold by adding bFGF, EGF, TNF- α ($P < 0.05$); Adding GM-CSF had no significant effect on the binding.

Conclusion bFGF, EGF, and TNF may play role in regulation of scavenger receptor activity of SMCs.

KEY WORDS Cytokines; Growth factor, epidermal; Growth factor, basic fibroblast; Muscle, smooth; Scavenger receptor

摘要 为探讨有关的细胞因子和生长因子是否影响平滑肌细胞清道夫受体与氧化型低密度脂蛋白结合活性,以 Cu^{2+} 氧化法制备的氧化型低密度脂蛋白免疫豚鼠,制备抗氧化型低密度脂蛋白抗体,在培养的小牛主动脉平滑肌细胞中,用细胞酶联免疫吸附检测法测定清道夫受体结合氧化型低密度脂蛋白的活性。结果发现,碱性纤维母细胞生长因子、表皮生长因子、肿瘤坏死因子可提高血管平滑肌细胞表面清道夫受体活性,而粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子对清道夫受体活性无影响。此结果提示,某些细胞因子、生长因子对平滑肌细胞清道夫受体活性具有调节作用。

关键词 细胞因子; 生长因子; 肌,平滑; 清道夫受体

氧化修饰的低密度脂蛋白与巨噬细胞或平滑肌细胞表面的清道夫受体结合后,被摄入细胞内,使得细胞内脂质堆积,形成泡沫细胞,这在动脉粥样硬化发生发展中起着重要作用。研究清道夫受体的调控因素,将有助于对动脉粥样硬化机理更深入的了解。过去对巨噬细胞的清道夫受体研究较多,对正常动脉壁平滑肌细胞的清道夫受体则认为其活性很低,对动脉粥样硬化病灶中肌源性泡沫细胞的形成机制也说法不一^[1]。我们曾发现巨噬细胞条件培养液能促进平滑肌细胞清道夫受体活性,引起细胞内脂质聚积^[2]。本实验进一步研究某些细胞因子和生长因子对清道夫受体的影响。

1 材料和方法

1.1 抗氧化型低密度脂蛋白抗体的制备

密度梯度超速离心法分离人低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)^[3]。以铜离子氧化法氧化LDL^[4]。取氧化型低密度脂蛋白(oxidized LDL, 氧化型LDL)免疫豚鼠,饱和硫酸铵法提取抗体。琼脂双向免疫扩散法测效价,酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测氧化型LDL与抗氧化型LDL的结合能力。

1.2 血管平滑肌细胞培养

取新生小牛主动脉中膜,剪碎贴块培养,培养液为含20%小牛血清的MEM培养液,待细胞长满瓶底后,改用10%小牛血清的MEM培养液传代培养。挑选同一批传代,生长铺满瓶底的细胞进行实验,实验细胞为5~10代。

1.3 清道夫受体测定

参照本实验室以前建立的细胞BA-ELSA法进行测定^[5]。细胞传代培养于96孔板上3天,长满孔底形成单层后分别加入碱性纤维母细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF; Promega) 20 mg/L(含10 mg/L肝素)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF; Promega) 10 mg/L、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α ; 邦定生物医学公司) 20 ku/L、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte macrophage colony stimulating factor, GM-CSF; 北京原平生物技术有限公司) 20 μ g/L, 37℃继续培养12 h, PBS洗三次, 2%多聚甲醛固定20 min, 1%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA) 4℃封闭、24 h,以减少非特异性吸附,然后加入3.5 mg/L氧化型LDL,使之与细胞表面的清道夫受体结合,最后依次加入10 mg/L豚鼠抗人氧化型LDL、10 mg/L兔抗豚鼠1:200羊抗兔-HRP。每次加样后均在37℃湿盒内放置45 min, PBS洗三次,最后加入底物显色,测光密度值,并经标准曲线换算成每孔氧化型LDL的包被浓度,表示氧化型LDL与清道夫受体的结合活性。

1.4 数据处理

实验各组取6个复孔,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, t 检验差异显著性。

2 结果

2.1 抗氧化型低密度脂蛋白抗体鉴定

琼脂糖双向免疫扩散法测抗氧化型LDL抗体的效价为1:32。

酶联免疫吸附测定法测定,氧化型LDL包被浓度在0.3 μ g/L至100 μ g/L之间与抗氧化型LDL的结合呈线性关系,光密度值范围在0.0~0.4之间。

2.2 两种细胞因子和两种生长因子对清道夫受体的影响

清道夫受体和氧化型LDL的结合活性由氧化型LDL包被浓度来表示,培养的血管平滑肌细胞中未加入细胞因子时,清道夫受体与氧化型LDL的结合活性是 4.8 ± 4.0 μ g/L,加入bFGF、EGF、TNF- α 使—得清道夫受体和氧化型LDL的结合活性分别提高到 14.4 ± 3.9 μ g/L、 12.8 ± 4.7 μ g/L、 12.9 ± 3.6 μ g/L,增加3~3.5倍。经 t 检验差异有显著性($P < 0.05$),而加入GM-CSF清道夫受体活性无明显提高(附表1, Table),说明TNF、FGF、EGF使得清道夫受体活性提高,而GM-CSF对清道夫受体活性无影响。

Table. Effect of bFGF, EGF, TNF, GM-CSF on scavenger receptor activity of smooth muscle cells.

Groups	Relative activity of scavenger receptor (μ g/L)
Control	4.8 ± 4.0
bFGF	14.4 ± 3.9^c
EGF	12.8 ± 4.7^b
TNF- α	12.9 ± 3.6^d
GM-CSF	6.3 ± 3.9

b: $P < 0.01$, c: $P < 0.005$, d: $P < 0.001$, compared with control group.

3 讨论

巨噬细胞和平滑肌细胞表面的清道夫受体和氧化修饰的LDL(氧化型LDL)结合,介导了脂质的摄取^[6,7],并且不受细胞内脂质堆积的下调作用影响,不断摄取氧化型LDL引起脂质堆积,从而导致泡沫细胞的形成。

平滑肌细胞通常在受到刺激时可增强清道夫受体mRNA的表达^[8],我们以前的实验曾证实巨噬细胞条件培养液孵育后,可增强平滑肌

细胞清道夫受体活性,使与氧化型 LDL 的结合和摄取量增加,导致细胞内脂质积聚^[2]。我们在实验中观察到,在用普通培养液培养的对照组中,平滑肌细胞表面清道夫受体和氧化型 LDL 的结合活性很低,但加入细胞因子 TNF- α 和生长因子 bFGF、EGF 后,细胞表面清道夫受体的结合活性明显增加,提示这些因子可以促进平滑肌细胞清道夫受体的表达,而 GM-CSF 对此影响不大。动脉粥样硬化时,内皮细胞和巨噬细胞被激活并促进这些因子的分泌^[8~10]。据报道,平滑肌细胞表面有 bFGF、EGF、TNF- α 受体^[11,12],而有关平滑肌细胞表面 GM-CSF 受体目前尚未见报道。由此推测,这些因子使得平滑肌细胞清道夫受体活性提高,可能是通过相应受体来发挥作用的,使得清道夫受体活性增加,脂质摄取增加而导致肌源性泡沫细胞的形成。

动脉粥样硬化病灶中可测出多种细胞因子和生长因子^[13],有些因子对清道夫受体的表达具有调节作用,正如我们的实验所证实的那样。然而动脉粥样硬化病灶中的细胞因子和生长因子是多种多样的,在病变的不同阶段浓度也不同,对清道夫受体的作用将是多种因素综合作用的结果,进一步研究其他的因子及其对清道夫受体的作用,将有助于进一步深入了解清道夫受体的调节机制。

参考文献

- 1 Pitas RE. Expression of the acetyl low density lipoprotein receptor by rabbit fibroblasts and smooth muscle cells: Upregulation by phorbol esters. *J Biol Chem*, 1990, **265**: 12 722.
- 2 张骅,楼定安,单祉茵,等. 巨噬细胞对肌源性泡沫细胞生成的影响. 中国动脉硬化杂志, 1996, **4**(4): 260~263.
- 3 Chung BH, Wilkinsen T, Geer JC, et al. Preparative and quantitative isolation of plasma lipoproteins. *J Lipid Res*, 1980, **21**: 284~291.
- 4 Matthew L, Helen H, Jerryr M, et al. Lipid hydroperoxy and hydroxy devivatives in copper-catalyzed oxidator of low density lipoprotein. *J Lipid Res*, 1990, **31** (6): 1 043~050.
- 5 朱伟民,楼定安. BA-ELSA 法测定培养细胞的低密度脂蛋白受体活性. 生物化学与生物物理学报, 1992, **24** (3): 259~265.
- 6 Li H, Freeman MW, Libby P. Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression in vivo by atherogenic diets and in vitro by cytokines. *J Clin Invest*, 1995, **95** (1): 122~133.
- 7 Matsumoto A, Naito M, Itakura H, et al. Human macrophage scavenger receptors: primary structure, expression, and localization in atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87** (23): 9 133~137.
- 8 Gajdusek CM, Carbon S. Injury-induced release of basic fibroblast growth factor from bovine aortic endothelium. *J Cell Physiol*, 1989, **139** (3): 570~579.
- 9 Tipping PG, Hancock WW. Production of tumor necrosis factor and interleukin-1 by macrophages from human atheromatous plaques. *Am J Pathol*, 1993, **142** (6): 1 721~728.
- 10 Masafumi T, Seiichi K, Yusuke F, et al. Human monocyte endothelial cell interaction induces synthesis of granulocyte macrophage colony-stimulation factor. *Circulation*, 1996, **93** (6): 1 185~193.
- 11 Adriane SR, Annette S, Gunter B, et al. Heparin-induced overexpression of basic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor receptor, and cell-associated proteoglycan sulfate in cultured coronary smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, **16** (8): 1 063~069.
- 12 Saltis J, Thomas AC, Agrotis A, et al. Expression of growth factor receptors in arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 1995, **118** (1): 77~87.
- 13 Steven KC, Peter L. Cytokines and growth factors in atherogenesis. *Arch Pathol Lab Med*, 1992, **116**: 1 292~300.

(1997-10-07 收到)