

# EGF、bFGF 和 PHGF 对大鼠骨骼肌卫星细胞增殖的影响

邵素霞<sup>1</sup> 马洪骏<sup>1</sup> 赵春芳<sup>1</sup> 张雷<sup>1\*</sup> 郑力芬<sup>2</sup> 闫蕴力<sup>2</sup> 胡嵩园<sup>1</sup>

(河北医科大学,<sup>1</sup>组织学和胚胎学教研室,<sup>2</sup>基础医学研究所细胞生物学室,石家庄 050017)

**摘要** 用 MTT、流式细胞技术、溴脱氧核苷尿嘧啶(bromodeoxyuridine, BrdU)掺入法及免疫细胞化学检测增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的方法探讨了表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)及促肝细胞生长因子(hepatocyte growth-promoting factor, PHGF)对大鼠骨骼肌卫星细胞增殖的影响。结果表明 bFGF、PHGF 对骨骼肌卫星细胞有较强的促增殖作用,且两者之间无差别,bFGF 最佳作用浓度为 5  $\mu\text{g/L}$ , PHGF 最佳作用浓度为 10  $\mu\text{g/ml}$ 。与其他生长因子相比,PHGF 价格低廉易于获取,适宜推广。EGF 增殖作用不明显。

**关键词** 骨骼肌卫星细胞; 生长因子; 增殖

成年个体心肌一旦损伤只能由纤维结缔组织所代替,目前对心肌梗死的一些治疗手段如冠状动脉旁路移植术,只能恢复再灌注,而不能逆转已坏死的心肌。而收缩细胞的缺失可导致心衰造成死亡。细胞移植现被认为是增强心脏功能及限制心肌梗死扩大的重要方法<sup>[1]</sup>。在有关细胞移植的众多研究中,骨骼肌卫星细胞由于可从病人自身得到,移植时无免疫排斥反应,故卫星细胞移植治疗心肌梗死更容易应用于临床。但卫星细胞数目较少,大约占骨骼肌总细胞核数的 4%,故需在体外快速增殖以达到临床应用细胞数量,缩短治疗周期。本文采用多种方法探讨了表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)及促肝细胞生长因子(hepatocyte growth-promoting factor, PHGF)对大鼠骨骼肌卫星细胞增殖的影响,以期找到一种良好的促增殖因子,为临床相关研究提供参考资料。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

利用本实验室建立的方法<sup>[2]</sup>分离纯化培养新生大鼠骨骼肌卫星细胞,选用第 4 代细胞进行实验。实验所用药物名称:人重组表皮生长因子 EGF (Prpro),人重组碱性成纤维细胞生长因子 bFGF

(Prpro),牛重组碱性成纤维细胞生长因子 bFGF(长春长生基因药业股份有限公司),促肝细胞生长因子 PHGF(广东阳江制药厂有限公司)。药物浓度根据文献及预实验设定(表 1)。

### 1.2 MTT 检测

骨骼肌卫星细胞经胰蛋白酶消化以  $1 \times 10^4$  个/ ml 传至 96 孔板,每孔加 100  $\mu\text{l}$  基础培养液(含 10% 胎牛血清的 M199 培养液)。24 h 后,对照组每孔仍加入 100  $\mu\text{l}$  基础培养液,实验组中,每孔加入 100  $\mu\text{l}$  按比例稀释的含有细胞因子的基础培养液,每种生长因子每种浓度接种 5 孔,培养 3 天后,每孔加入 MTT(5 g/L)20  $\mu\text{l}$ ,继续培养 4 h,吸弃上清,每孔加入 DMSO 150  $\mu\text{l}$ ,充分震荡 15 min,酶联免疫分析仪测定每孔  $A_{490}$  值。找出每种因子的最佳作用浓度。

### 1.3 流式细胞仪测定细胞周期

第 4 代细胞生长 24 h 后,用每种生长因子的最佳作用浓度作用于细胞 72 h,然后用流式细胞仪测定细胞周期,计算增殖指数 PI(proliferative index), $PI = [(S+G_2/M)/(G_0/G_1+S+G_2/M)] \times 100\%$ 。

### 1.4 BrdU 掺入法检测各种因子对卫星细胞增殖的影响

收稿日期:2003-11-25 接受日期:2004-02-09

\*通讯作者。Tel: 0311-6265608, E-mail: zhanglei@hebm.edu.cn

表1 药物种类及浓度分组

药物名称	种类	1组	2组	3组	4组	5组
人EGF(Prpro)	基因工程制品	对照	10 µg/L	50 µg/L	250 µg/L	1250 µg/L
人bFGF(Prpro)	基因工程制品	对照	2.5 µg/L	5 µg/L	10 µg/L	20 µg/L
牛bFGF(国产)	基因工程制品	对照	2 u/ml	20 u/ml	200 u/ml	2000 u/ml
猪PHGF(国产)	基因工程制品	对照	2 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	250 µg/ml

第4代细胞以  $8 \times 10^4$  个/ml 细胞数接种于盖玻片上, 培养 24 h 后, 用每种生长因子的最佳作用浓度作用于细胞 72 h, 培养终止前 40 min 加入 BrdU (20 µg/ml), 冷 PBS 冲洗后 4% 多聚甲醛固定 1 h, 甲酰胺 100 °C 5 min, 2 mol/L HCl 37 °C 5 min, 血清 37 °C 封闭 20 min, 加鼠抗 BrdU 抗体工作液(博士德产品)4 °C 过夜, 生物素化二抗 37 °C 1 h, 辣根过氧化物酶(HRP)标记链酶卵白素 37 °C 1 h, DAB 显色。分别计数 10 个高倍视野中细胞总数及 BrdU 阳性细胞数, 计算出标记率。

### 1.5 免疫组化方法检测各种因子对卫星细胞 PCNA 表达的影响

第4代细胞生长 24 h 后, 用每种生长因子的最佳作用浓度作用于细胞 72 h 后, 冷 PBS 冲洗, 4% 多聚甲醛固定 1 h, 抗原热修复(95 °C)5 min, 加鼠抗 PCNA 抗体工作液 4 °C 过两夜, 生物素化二抗 37 °C 1 h, 辣根过氧化物酶(HRP)标记链酶卵白素 37 °C 1 h, DAB 显色。统计 PCNA 阳性率方法同 1.4。

### 1.6 统计方法

用 STATA 统计软件中的方差分析且两两比较统计结果。

## 2 结果

表2 EGF对卫星细胞增殖的影响

序号	分组	A 值(M ± SD)
1	对照组	0.1046 ± 0.0129
2	10 µg/L	0.1576 ± 0.0080*
3	50 µg/L	0.1803 ± 0.0176*
4	250 µg/L	0.2896 ± 0.0345**
5	1250 µg/L	0.2503 ± 0.0172**

与对照组相比: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

表3 bFGF对卫星细胞增殖的影响

序号	分组	A 值(M ± SD)
1	对照组	0.1046 ± 0.0129
2	2.5 µg/L	0.2599 ± 0.005*
3	5 µg/L	0.305 ± 0.0106*
4	10 µg/L	0.307 ± 0.0399*
5	20 µg/L	0.355 ± 0.0267*

与对照组相比: \* $P < 0.01$ 。

### 2.1 MTT 结果

2.1.1 EGF对卫星细胞增殖的影响 不同浓度EGF均对卫星细胞有促增殖作用, 但第4组与对照组之间差别极显著且用量少, 故选用 250 µg/L 为最佳浓度(见表2)。

2.1.2 bFGF(Prpro)对卫星细胞增殖的影响 不同浓度bFGF均对卫星细胞有促增殖作用。第3、4、5组显著高于第2组( $P < 0.05$ ), 第3、4组之间无差别( $P > 0.05$ ), 第5组明显高于第3、4组( $0.01 < P < 0.05$ ), 5 µg/L bFGF组对卫星细胞增作用明显且用量少, 为最佳浓度(见表3)。

2.1.3 bFGF(国产)对卫星细胞增殖的影响 不同浓度bFGF对骨骼肌卫星细胞作用显著, 但各加药组之间无差别( $P > 0.05$ ), 故选用最低浓度 2 u/ml 为最佳浓度(见表4)。

2.1.4 PHGF对卫星细胞增殖的影响 各实验组显著高于对照组, 3、4、5组显著高于第2组( $P < 0.05$ ), 且它们之间无差别( $P > 0.05$ ), 故选用 10 µg/ml 为最佳作用浓度(见表5)。

### 2.2 4种因子对卫星细胞细胞周期的影响

统计结果显示第2组增殖指数PI与对照组PI相比无差别( $P > 0.05$ ), 第3、4、5组增殖指数PI明显高于对照组PI( $P < 0.01$ ), 且第3、4、5组之间无差别(见表6)。

表4 bFGF(国产)对卫星细胞增殖的影响

序号	分组	A 值(M ± SD)
1	对照组	0.1046 ± 0.0129
2	2 u/ml	0.2516 ± 0.0050*
3	20 u/ml	0.2776 ± 0.0122*
4	200 u/ml	0.2486 ± 0.0076*
5	2000 u/ml	0.2623 ± 0.0150*

与对照组相比: \* $P < 0.01$ 。

表5 PHGF对卫星细胞增殖的影响

序号	分组	A 值(M ± SD)
1	对照组	0.1046 ± 0.0129
2	2 µg/ml	0.2440 ± 0.0131*
3	10 µg/ml	0.2996 ± 0.0110*
4	50 µg/ml	0.3056 ± 0.0077*
5	250 µg/ml	0.3186 ± 0.0337*

与对照组相比: \* $P < 0.01$ 。

表6 4种因子对卫星细胞细胞周期的影响( $n=4$ , %)

序号	分组	PI
1	对照组	13.66 ± 0.9320
2	250 μg/L EGF	16.48 ± 0.5524
3	5 μg/L bFGF(Prpro)	19.39 ± 1.3761
4	2 u/ml bFGF(国产)	18.08 ± 0.3329
5	10 μg/ml PHGF	20.04 ± 1.125

表7 4种因子对卫星细胞 BrdU 掺入的影响

序号	分组	BrdU 标记率(%)
1	对照组	11.86 ± 1.28
2	250 μg/L EGF	11.43 ± 1.68
3	5 μg/L bFGF(Prpro)	22.12 ± 3.21
4	2 u/ml bFGF(国产)	13.64 ± 2.58
5	10 μg/ml PHGF	29.53 ± 1.73

表8 4种因子对卫星细胞中 PCNA 表达的影响

序号	分组	PCNA 阳性率(%)
1	对照组	51.05 ± 6.9376
2	250 μg/L EGF	57.1 ± 4.7121
3	5 μg/L bFGF(Prpro)	78.19 ± 5.304
4	2 u/ml bFGF(国产)	65.56 ± 7.907
5	10 μg/ml PHGF	76.45 ± 6.7412

### 2.3 4种因子对卫星细胞 BrdU 掺入的影响

统计结果显示第3、5组 BrdU 标记率明显高于第1组(对照组)( $P<0.01$ ), 第5组 BrdU 标记率明显高于第3组( $P<0.01$ )。第2、4组与对照组之间差异不显著( $P>0.05$ )(见表7)。

### 2.4 4种因子对卫星细胞中 PCNA 表达的影响

结果显示第3、4、5组 PCNA 的阳性率明显高于对照组, 第3、5组 PCNA 的阳性率明显高于第4组( $P<0.01$ ), 3、5组之间无差别( $P>0.05$ )(见表8)。

## 3 讨论

骨骼肌卫星细胞是位于骨骼肌肌细胞膜和基膜之间, 具有增殖分化潜能的肌源性干细胞。通常处于静止状态, 当骨骼肌受到损伤, 卫星细胞被激活, 进而增殖分化, 融合成新的骨骼肌纤维, 以修复受损的骨骼肌。骨骼肌卫星细胞的增殖与分化是由细胞连接、细胞与细胞外间质的相互作用及生长因子决定的, 其中生长因子的作用显著<sup>[3]</sup>。已知的调节卫星细胞增殖与分化的生长因子包括成纤维细胞生长因子(FGF), 转移生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ ), 胰岛素样生长因子(IGF-I, IGF-II), 肝细胞生长因子(HGF), 表皮生长因子(EGF)等<sup>[3-7]</sup>, 其中以 bFGF 促增殖能力最强。本实验结果表明在 EGF、bFGF

(进口)和 PHGF 三种生长因子中, bFGF 对卫星细胞的增殖能力最强, 这与文献结果一致, 且表明其增殖能力在达到最佳状态后保持不变, 并不随浓度的增加无限增大。另外, 本实验证实国产牛 bFGF 对卫星细胞的增殖作用明显不如进口人 bFGF, 这可能与药物质量或种属因素有关, 在选择作用因子时应予以考虑。

HGF 能够激活休眠的卫星细胞, 缩短静息卫星细胞进入分裂周期的时间<sup>[3]</sup>。PHGF 是一种从新生乳猪肝脏中提取纯化制备而成的小分子多肽类活性物质, 能明显刺激新生肝细胞的 DNA 合成, 促进肝细胞再生, 加速肝脏组织修复, 恢复肝功能, 现试用于体外扩增卫星细胞, 结果表明其促增殖能力与 bFGF 无显著性差异。本实验结果还证实 PHGF 作用效果在达到最佳状态时随浓度的增加基本保持不变, 这种作用与 bFGF 的作用趋势类似, 但与张臻等<sup>[8]</sup>所得结果略有不同, 其作用机制有待于做进一步的研究。PHGF 与其他生长因子相比价格低廉易于获取, 适宜推广。

EGF 主要促进表皮细胞生长和角质化, 是一种促进间充质细胞和表皮细胞进行有丝分裂的丝裂源, 有关其促进骨骼肌卫星细胞增殖的研究不多。徐蓬等<sup>[9]</sup>的研究表明 EGF 对体外兔骨骼肌卫星细胞有促增殖作用, 且随着作用浓度和时间的延长而增强。但本实验用 EGF 作用于大鼠骨骼肌卫星细胞后, 除 MTT 结果表明 EGF 对卫星细胞有增殖作用外, BrdU 掺入、PCNA 免疫组化检测、流式细胞仪分析的结果表明其增殖作用虽然有增加的趋势, 但与对照组相比无显著性差异, 综合以上结果认为 EGF 对大鼠骨骼肌卫星细胞增殖作用不明显。EGF 作用是否有种属差别, 有待于进一步研究。

总之, 通过多种研究手段证实了 bFGF、PHGF 对大鼠骨骼肌卫星细胞有较强的促增殖作用, 且两者之间无差别, 最佳作用浓度分别为 5 μg/L、10 μg/ml。EGF 增殖作用不明显。

### 参考文献 (References)

- [1] Scorsin M et al. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, 119:1169
- [2] 邵素霞等. *基础医学与临床*, 2004, 24: 79
- [3] Kastner S et al. *J Histochem Cytochem*, 2000, 48: 1079
- [4] Yablonska-Reuveni Z et al. *J Histochem Cytochem*, 1999, 47: 23
- [5] Layne MD et al. *Exp Cell Res*, 1999, 249: 177
- [6] Napier JR et al. *J Endocrinol*, 1999, 163: 63
- [7] 王劲等. *生命的化学*, 2002, 22: 18
- [8] 张臻等. *上海实验动物科学*, 2000, 20: 72
- [9] 徐蓬等. *中华口腔医学杂志*, 2000, 35: 289

## The Effects of EGF, bFGF and PHGF on the Growth of Rat Skeletal Muscle Satellite Cell

Su-Xia Shao<sup>1</sup>, Hong-Jun Ma<sup>1</sup>, Chun-Fang Zhao<sup>1</sup>, Lei Zhang<sup>1\*</sup>, Li-Fen Zheng<sup>2</sup>, Yun-Li Yan<sup>2</sup>, Ai-Yuan Hu<sup>1</sup>  
(<sup>1</sup>Department of Histology and Embryology, <sup>2</sup>Cell Biology Division, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

**Abstract** MTT method, flow cytometry, BrdU incorporation and PCNA immunocytochemistry were used to study the effects of basic fibroblast growth factor (bFGF), epidermal growth factor (EGF) and hepatocyte growth-promoting factor (PHGF) on the growth of rat skeletal muscle satellite cells. The results showed that bFGF and PHGF enhanced the proliferation of satellite cells. There was no difference between bFGF and PHGF. The best concentration of bFGF and PHGF was 5 µg/L and 10 µg/ml, respectively. Compared with other growth factors, PHGF was cheaper and easy to obtain, so it was suited to apply. The effect of EGF appeared not to be significant.

**Key words** skeletal muscle satellite cell; growth factor; proliferation

Received: November 25, 2003 Accepted: February 9, 2004

\*Corresponding author. Tel: 86-311-6265608, E-mail: zhanglei@hebm.u.edu.cn

.....  
: 新产品介绍:  
.....

### 新型清洗液——DECON90

所有实验室都会遇到清洗的问题, 高标准的清洗是需要的, 这就给实验室带来了比较困难的问题和繁重的工作。特别是随着科学技术的进步和发展, 对清洗的要求和标准也有了更高的要求。迄今为止在中国许多实验室一直是在延续使用铬酸盐混合洗液或类似腐蚀剂如硫酸做清洗液, 或家用洗衣粉, 家用洗涤剂清洗产品, 这一过程的缺点是:

- a) 酸的价格是贵的并且需要小心地处理、存放、使用和处置。配制酸的混合物是危险的, 对于不熟练的技术人员和学生来说在操作过程中这一高腐蚀特性的酸形成了特殊的危险性。
- b) 长时间的浸泡可以去掉某些污染物, 其他是完全不能被酸的混合物腐蚀掉。对于有特殊用途的较昂贵的校准仪器在处理时容易受到影响。
- c) 酸的蒸气和重金属对人的健康造成危害, 也对环境造成无法挽回的污染。洗衣粉和洗涤剂不易清洗掉, 需要大量水冲洗, 否则残留较多, 并留有水渍。对于我们这样一个缺水的国家来说, 水是十分宝贵的, 特别是水价在不断上涨, 也需要考虑经济因素。

面对上述情况, 实验室迫切需要新型的清洗液, 既能满足清洗的需要, 又可以不对人、设备和环境造成危害, 英国公司生产的迪康 (DECON90) 清洗液经过多方的实验和长期使用取得了良好的效果, 并已在英国、美国等欧洲、北美地区得到广泛的认同和使用。

J.R.Bradshaw 先生是英国 British Technical College 学院的高级讲师, 做了相关的实验来比较在实验室清洗实验仪器使用两种表面活性剂和铬酸盐洗液的不同。一种进口的浓缩洗液给出比铬酸盐洗液更好的结果, 但证明是不理想的, 也认定是不可免冲洗的和不可以清洗到无菌状态。迪康 (DECON90) 清洗液在所有实验中给出了最好的表现。我们估计使用浓缩的迪康 (DECON90) 洗液做同样的工作比用酸洗的费用要低 25%。使用迪康 (DECON90) 洗液可以替代酸洗。

英国迪康(DECON)清洗液中国总代理: 北京利源诚友科贸公司  
北京朝阳区八里庄东里北巷3号楼1单元9号, 邮编 100025  
电话: 010-65402756; 13501399312