

THE DIFFERENT GENE RESPONSE IN THE PROCEDURE OF FIBROBLAST PROLIFERATION INDUCED BY CTGF AND FGF

WANG Jiong DONG Cheng Hong WANG Li Chun SUN Ming LI Qi Han*
(Institute of Medical Biology, Peijing Union Medical Collage,
Chinese Academy of Medical Science, Kun ming 650118, China)

ABSTRACT

Connective Tissue Growth Factor(CTGF) is a product of immediately early gene, which has the similar effect of stimulating fibroblast proliferation as FGF, but CTGF and FGF have different gene response in this process, CTGF induced cell expression of c-myc oncogene, FGF stimulated c-fos oncogene expression; on the other hand CTGF and FGF both can induce src gene expression and the result of the immunological precipitation with anti-phosphotyrosine antibody suggested that tyrosine phosphorylation of a protein in KMB-17 perhaps is related with the signal transduction of CTGF.

Key words: CTGF FGF Fibroblast Gene response Tyrosine phosphorylation

蛋白聚糖和溶血磷脂酸对不同细胞周期 心脏成纤维细胞生长的影响

何兰杰* 丛祥凤 常文静 陈曦**

(中国医学科学院 中国协和医科大学 阜外心血管病医院 北京 100037)

心肌肥厚是高血压、冠心病等多种心血管疾病发展过程中共同的病理生理改变,是多种因素相互作用的结果。心脏成纤维细胞的增殖是心肌肥厚的重要因素之一,研究一些生物活性物质对心脏成纤维细胞增殖的调节作用,对控制心肌肥厚的发生和发展有重要的价值。

蛋白聚糖(PGs)是血管壁内皮细胞和平滑肌细胞合成并分泌的活性物质,除作为细胞基质的重要成分外,还是许多生长因子的受体或亚受体^[1,2],参与血管壁、神经、肿瘤组织中多种细胞的生长调节^[3-6],但PGs对心脏细胞生长的影响还未见报道。溶血磷脂酸(LPA)是近年来发现的一种十分活跃的脂质信号分子,在神经组织和心血管系统中有多种生物学功能^[7,8],然而它在心脏组织中的作用,还缺乏认识。本文通过观察这两种生物活性物质对培养的处于不同细胞周期的乳鼠心脏成纤维细胞生长的影响,同时分析PGs和LPA对成纤维细胞生长的调节作用,为探讨它们在心肌肥厚发病机理中的作用和临床防治提供新的思路。

材料与方法

1. 主要试剂

DMEM培养粉(Gibco),胎牛血清(天津血研所),胰蛋白酶(Sigma),LPA(Sigma),³H-TdR(中科院原子能所),牛主动脉PGs(本室提取),其他试剂均为北京化工厂分析纯试剂。

2. 动物

1-3天SD乳鼠(北京医科大学动物部提供)。

3. 含牛主动脉PGs细胞培养液的制备

按文献^[5]制备。

4. 乳鼠心脏成纤维细胞的培养

参照文献^[9],取1-3天的SD乳鼠心脏,差速贴壁法获取心脏成纤维细胞,37℃、5%CO₂培养箱中培养细胞。当细胞生长至次汇合状态,以不同浓度的血清继续培养细胞不同的时间,流式细胞术鉴定细胞所处的细胞周期。

本文2000年10月30日收到,2001年3月19日接受。

本研究受北京市自然科学基金(7982031)资助。

*宁夏医学院附属医院心内科。

**项目负责人。

5. 流式细胞术测定培养的心脏成纤维细胞所处的细胞周期

参照文献^[10]将原培养液弃掉,加入传代消化液悬浮细胞,离心收集细胞,以适量磷酸盐缓冲液(PBS)重悬细胞后,在细胞悬液中缓慢加入95%的乙醇,至终浓度为70%,4℃保存,以EPICS ELITE ESP型流式细胞仪测定细胞所处的细胞周期。

6. ³H-TdR 参入法测定细胞的 DNA 合成

参照文献^[11],将生长至汇合状态的原代心脏成纤维细胞消化、离心、收集后,按 5×10^{-4} 接种于24孔板,细胞培养至次汇合状态后,以不同浓度血清培养细胞,按实验需要使细胞进入G0/G1或G2期后加入不同药物(对照组、PGs组、LPA组、PGs+LPA组)培养18小时,每孔加入0.5μCi³H-TdR,继续培养细胞至6h(总计药物刺激24小时),收集0.5ml细胞裂解液于装有8ml闪烁液的闪烁瓶中混匀,于液闪计数器(LKB WAL-LAC 1215 RACKBETA)计数。

7. 统计分析

每次实验进行3-4孔平行操作,实验重复3次,结果以平均数±标准差表示,采用Excel统计程序对数据进行方差分析,部分资料进行相关性检验。

结 果

1. 不同浓度血清培养的乳鼠心脏成纤维细胞所处的细胞周期的鉴定

培养至次汇合状态的乳鼠心脏成纤维细胞经含0.4%FBS的DMEM饥饿培养48小时,流式细胞术测定细胞周期,G0/G1期细胞占88.5%,G2期细胞占1.0%,S期细胞占10.5%(图1),经0.4%FBS饥饿培养48小时后再用2%FBS培养细胞24小时,G2期细胞占91.7%,G1期细胞占7.7%,S期细胞占0.5%(图1)。说明饥饿48小时的细胞同步于G0/G1期,再经2%FBS刺激生长24小时的细胞同步于G2期,符合下步实验要求,同时为不同细胞周期的研究提供了良好的实验模型。

2. PGs 对乳鼠心脏成纤维细胞 DAN 合成的影响

在2.94-47.04μg/ml浓度范围内,牛主动脉PGs刺激心脏成纤维细胞24小时后对G0/G1期和G2期细胞的DNA合成均有抑制

作用,最大抑制达90%以上,但不同细胞周期的细胞对PGs作用的敏感性不同。对G0/G1期细胞,2.94μg/ml PGs的抑制强度已接近饱和,其抑制率为对照的80%;对G2期细胞,2.94μg/ml PGs的抑制作用仅为对照的13%,23.52μg/ml PGs的抑制率方达对照的83%(图2)。

3. LPA 对乳鼠心脏成纤维细胞 DNA 合成的影响

在1-80μmol/L浓度范围内,LPA刺激心脏成纤维细胞24小时后G0/G1期及G2期细胞的DNA合成均有增加,LPA作用浓度与DNA合成增加率呈正相关($r_{G0/G1} = 0.84, P < 0.01, r_{G2} = 0.79, P < 0.01$)。50μmol/L LPA对G0/G1期及G2期细胞的DNA合成促进作用最大,比对照组分别增加 $78 \pm 24\%$ ($P < 0.05$)和 $122 \pm 21\%$ ($P < 0.01$,图3)。

低浓度LPA(1-30μmol/L)对G0/G1和G2期细胞的作用相似,但高浓度LPA(50μmol/L)对G2期的作用显著高于对G1期的作用。

4. PGs 对 LPA 活性的调节作用

由图4可见,当存在10μmol/L LPA条件下,2.94-47.04μg/ml PGs分别使G0/G1期和G2期DNA合成下降为对照的 $36 \pm 11\% - 15 \pm 10\%$ 和 $91 \pm 13\% - 3 \pm 1\%$ 。说明PGs可抑制10μmol/L的LPA诱导的不同细胞周期的心脏成纤维细胞增殖。

讨 论

细胞周期中有两个控制点:一是处于G1/S转折点,控制细胞从静止状态(G1期)进入DNA合成期(S期);另一个控制点处于G2/M转折点,是决定细胞一分为二的控制点^[12]。本实验证实培养的乳鼠心脏成纤维细胞经低血清饥饿48小时可同步于G0/G1期;同步于G0/G1期的细胞经2%FBS刺激生长24小时可同步于G2期,为细胞周期两个控制点的研究提供了一个良好的实验模型。

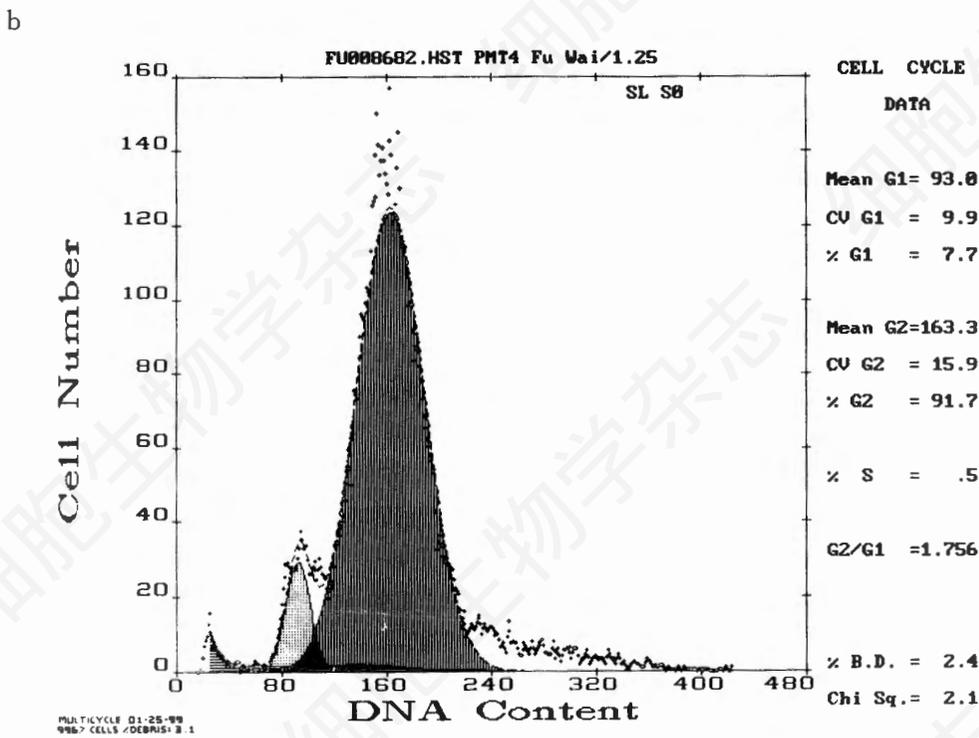
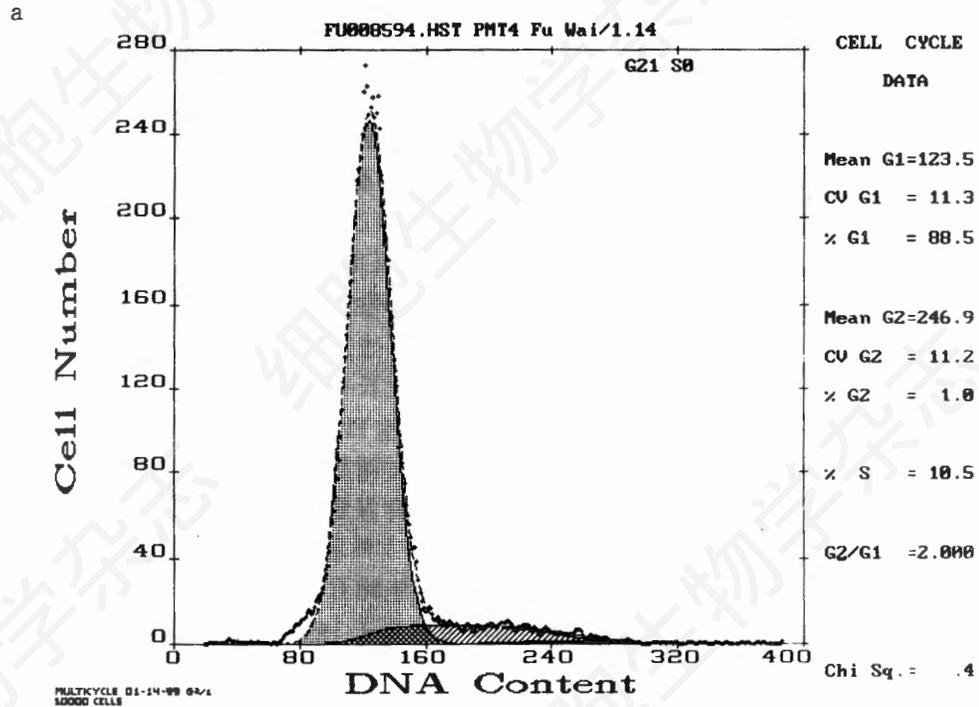


图1 流式细胞术分析细胞周期

心脏成纤维细胞经含0.4% FBS的DMEM处理48小时,达到静息生长状态(a)或静息的细胞经含2% FBS的DMEM处理24小时(b),然后收集细胞分析其细胞周期。

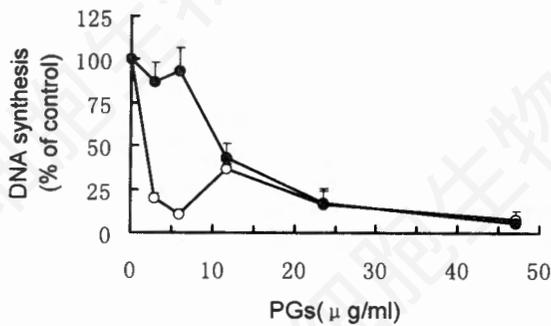


图2 PGs对G0/G1期和G2期大鼠心脏成纤维细胞生长的抑制作用

PGs刺激G0/G1(○)或G2(●)期心脏成纤维细胞24小时,³H-TdR存在于药物刺激时程的最后4小时。图中数值代表3-4次独立实验的 $\bar{x} \pm SD$ (每次实验含3-4个重复样本)。

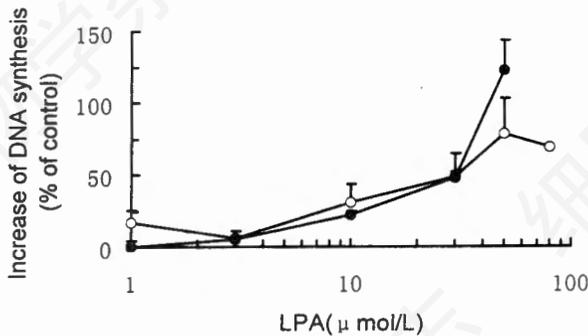


图3 LPA对大鼠心脏成纤维细胞DNA合成的影响

LPA刺激G0/G1(○)或G2(●)期心脏成纤维细胞24小时,³H-TdR存在于药物刺激时程的最后4小时。图中数值代表3-7次独立实验的 $\bar{x} \pm SD$ (每次实验含3-4个重复样本)。

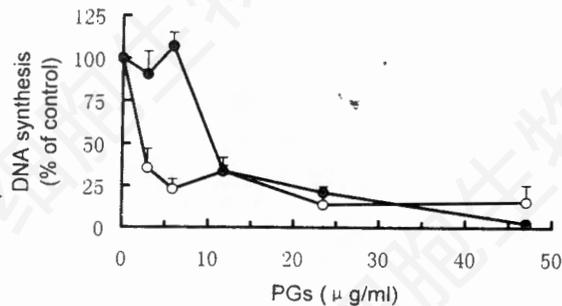


图4 PGs对LPA诱导的DNA合成的影响

在10 μ M LPA存在下,PGs刺激G0/G1(○)或G2(●)期心脏成纤维细胞24小时,³H-TdR存在于药物刺激时程的最后4小时。图中数值代表3-4次独立实验的 $\bar{x} \pm SD$ (每次实验含3-4个重复样本)。

蛋白聚糖(PGs)是糖胺聚糖以其共价键与核心蛋白结合形成的生物分子,主要由血管内皮细胞和平滑肌细胞合成并分泌。在人的血管壁已经发现至少3种PGs,即:硫酸软骨素PG(CSPG),硫酸皮肤素硫酸软骨素PG(DSC-SPG)和硫酸乙酰肝素PG(HSPG)。以往人们认为,PGs仅是细胞之间的填充物质,对维持血管壁的黏弹性等有重要作用。近年来研究发现PGs还是某些生长因子的受体或亚受体,对多种细胞的生长有调节作用。我们过去的研究表明人主动脉HSPG可抑制培养的人主动脉平滑肌细胞的增殖,而促进内皮细胞的增殖^[5,6]。最近的研究发现牛主动脉HSPG、CSPG、DSC-SPG以及3种混合的PGs对培养的人主动脉平滑肌细胞均有抑制作用,3种混合PGs的抑制作用略高于HSPG以外的其他两种PGs单独的抑制作用^[13]。上述研究结果提示PGs可能在抗动脉粥样硬化方面有积极作用。心肌组织中富含冠状动脉,血管内皮细胞分泌的PGs是否可以通过细胞间相互作用调节心脏成纤维细胞的生长尚未见报道。本研究观察到混合的牛主动脉PGs能抑制培养的不同细胞周期的乳鼠心脏成纤维细胞的DNA合成,对LPA这一具有生长因子性质的活性分子引起的细胞生长也有抑制作用,提示PGs可能在抗心肌肥厚中起某种积极作用。文献报道肝素抑制平滑肌细胞增殖是通过阻止细胞从G1期进入S期^[14]。PGs中的糖胺聚糖是多糖分子,HSPG中的多糖分子即硫酸乙酰肝素的结构和肝素相类似。本研究观察到PGs对G1期乳鼠心脏成纤维细胞DNA合成的最大抑制达90%以上,说明牛主动脉PGs与肝素作用类似,能够阻断细胞从G1期进入S期。

本研究结果显示,PGs对处于不同细胞周期的细胞DNA合成的抑制浓度曲线有明显差别。对G0/G1期细胞,2.94 μ g/ml PGs对DNA的抑制已达80%,接近饱和抑制程度;而对G2期细胞,23.52 μ g/ml PGs的抑制能力才达83%,两者相差近10倍。说明G0/G1期和G2

期的心脏成纤维细胞对PGs作用的敏感性显著不同。有文献报道,肝素对培养的静止期血管平滑肌细胞的抑制作用比指数生长期的细胞高50-100倍。静止期的细胞结合肝素的能力比指数期高8倍^[15]。牛主动脉混合PGs对G0/G1期和G2期心脏成纤维细胞抑制作用的差异可能与上述机制相似。

LPA是一种结构最简单的脂质信号分子。以往认为它仅仅是细胞膜的组成成分,近年研究发现,LPA通过激活G蛋白偶联受体在许多组织中发挥多种生物学功能,如调节多种细胞的生长、刺激血小板聚集、促使神经元细胞回缩等^[7,8]。但LPA对心脏组织的作用,所知极少。本课题组研究了LPA对心脏成纤维细胞增殖的影响(论文尚未发表)。本实验进一步观察到,LPA对处于不同细胞周期的心脏成纤维细胞的DNA合成均有明显的促进作用,并呈浓度依赖关系。然而,LPA刺激G0/G1期细胞和刺激G2期细胞的DNA合成的增加程度几乎相同,推测LPA的作用主要在于促进G1期进入S期,而对细胞周期中其他各期间的转换影响很小。当LPA浓度较高时(50 μ mol/L),其诱导G2期细胞DNA合成增加的作用明显高于G0/G1期细胞,提示细胞处于不同细胞周期时对LPA作用的敏感性可能不同,也可能是LPA与血清中其他生长因子产生协同作用。

PGs和LPA均是生物活性物质,但两者对乳鼠心脏成纤维细胞的DNA合成表现完全不同的生物学作用,其详细的作用机制有待于进一步研究。本实验提示,PGs和LPA对心肌肥厚的发生和发展作用不同,因此进一步研究PGs和LPA对心脏成纤维细胞增殖的调节作用及机制可能对防治心肌肥厚有重要意义。

摘 要

本文研究了蛋白聚糖(PG)和溶血磷脂酸(LPA)对培养的处于不同细胞周期的SD乳鼠心脏成纤维细胞生长的影响及PGs对LPA生物学活性的调节作用。采用流式细胞术测定细

胞所处的周期;³H-TdR 参入法测定细胞的DNA合成。研究结果表明:(1)培养至次融汇状态的乳鼠心脏成纤维细胞经低血清(0.4% FBS)饥饿培养48小时,G0/G1期细胞占88.5%;G0/G1期细胞经2% FBS刺激24小时,G2期细胞占91.7%。(2)PGs对G0/G1期和G2期的心脏成纤维细胞的DNA合成均有抑制作用。2.94-47.04 μ g/ml PGs对G0/G1期细胞DNA合成的抑制率为80%-93%;对G2期的抑制率为13%-94%。(3)1-80 μ mol/L范围内,LPA以浓度依赖方式促进不同细胞周期的心脏成纤维细胞DNA合成增加,50 μ mol/L LPA诱导G0/G1期和G2期细胞DNA合成的增加分别为78% \pm 24%和122% \pm 21%。(4)在10 μ mol/L LPA存在下,2.94-47.04 μ g/ml PGs使G0/G1期细胞和G2期细胞的DNA合成分别下降为对照的36% \pm 11%-15% \pm 10%和91% \pm 13%-3% \pm 1%,说明PGs可以抑制LPA诱导的心脏成纤维细胞DNA合成。上述研究结果提示:PGs和LPA对乳鼠心脏成纤维细胞G1期至S期的转换有重要的调节作用,并可能通过调节心脏成纤维细胞的生长影响心肌肥厚的形成和发展。

关键词:溶血磷脂酸 蛋白聚糖 细胞增殖 心脏成纤维细胞

参 考 文 献

- [1] Brickman YG, et al., 1995, *J Biol Chem*, **270**:24941-24948.
- [2] Liekens S, et al., 1999, *Mol Pharmacol*, **56**: 204-213.
- [3] Rapraeger AC, et al., 1991, *Science*, **252**: 1705-1708.
- [4] Turnbull J E, et al., 1993, *Biochem Soc Trans*, **21**: 477-482.
- [5] 丛祥凤等, 1996, 生物化学杂志, **12**: 599-602.
- [6] 张春玲等, 1996, 生物化学杂志, **12**: 191-194.
- [7] Moolenaar W H, 1995, *J Biol Chem*, **270**: 12949-12952.
- [8] 何兰杰, 2000, 细胞生物学杂志, **22**: 121-126.
- [9] 周晓霞等, 1997, 中国医学科学院学报, **19**: 35-

40.
 [10] 司徒镇强,吴云主编.组织细胞培养技术.世界图书出版公司.1996年出版.
 [11] 周晓霞等,1995,细胞生物学杂志,17:37-40.
 [12] 杜国光,细胞周期及调节.刘景生主编,《细胞信息与调控》,第一版,北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社,1998,p317-338.
 [13] 丛祥凤等,1999,中国动脉硬化杂志,7:30-33.
 [14] Christopher FR et al.,1989,*J Biol Chem*,264:6990-6995.
 [15] Castellot J J, et al.,1985,*J Cell Physiol*,124:21-28.

EFFECTS OF PROTEOGLYCAN AND LYSOPHOSPHATIDIC ACID ON THE GROWTH OF CARDIAC FIBROBLASTS AT DIFFERENT CELL CYCLE

HE Lan Jie* CONG Xiang Feng CHANG Wen Jing CHEN Xi
 (Cardiovascular Institute and Fu Wai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing, 100037)

ABSTRACT

The effects of proteoglycans (PGs) and lysophosphatidic acid (LPA) on the DNA synthesis of SD neonatal rat cardiac fibroblasts at different cell cycle were investigated. Cell cycle was measured by Flow Cytometric analysis. DNA synthesis of cells was determined by ^3H -TdR incorporation. Results: (1) Sub-confluent cells having starved in DMEM containing 0.4% FBS for 48h, 88.5% of the cells were at G0/G1 phase of the cell cycle. 91.7% of cells entered G2 phase after the cells at G0/G1 phase were cultured in DMEM containing 2% FBS for 24h. (2) PGs inhibited DNA synthesis of cardiac fibroblasts at both G0/G1 and G2 phases of cell cycles. At 2.94-47.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$, PGs inhibited DNA synthesis of the cells at G0/G1 phase by 80%-93%, and the cells at G2 phase by 13%-94%. (3) At 1-80 $\mu\text{mol}/\text{L}$, LPA promoted DNA synthesis of cultured rat cardiac fibroblasts at different cell cycle in a concentration-dependent manner. 50 $\mu\text{mol}/\text{L}$ LPA induced the increase of DNA synthesis at G0/G1 phase and G2 phase by 78% \pm 24% and 122% \pm 21% respectively. (4) In the presence of 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ LPA, 2.94-47.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PGs inhibited DNA synthesis of the cells at G0/G1 phase to 36% \pm 11% - 15% \pm 10% of control and the cells at G2 phase to 91% \pm 13% - 3% \pm 1%, indicating that PGs inhibited LPA induced DNA synthesis of cardiac fibroblasts. These results suggest that both PGs and LPA may play an important role in the transition from G0/G1 phase to S phase of cell cycle of rat cardiac fibroblasts and in the conformation and the development of myocardial hypertrophy through growth regulation of cardiac fibroblasts.

Key words: Lysophosphatidic acid Proteoglycans Cardiac fibroblasts Proliferation

* : Ningxia Medical College Affiliated Hospital

大鼠视神经外植块中少突胶质细胞的选择性迁移

何平 沈馨亚 汪洋 邱云芳 刘才栋 杨勤

(复旦大学医学院解剖学教研室 上海 200032)

少突胶质细胞(oligodendrocyte)起源于前脑的室下区、后脑和脊髓的腹侧区,然后向背外侧迁移并分化、成熟,包裹神经元轴突形成髓鞘^[1,2]。为了更好地研究少突胶质细胞系的发育、迁移等特性,常采用中枢神经组织外植块培养方法,如采用脊髓外植块^[3]、神经垂体外植块^[4]和视神经外植块^[5]等。这些方法在空间

上和时间内基本反映了少突胶质细胞系的在体发育情况^[3],从植块中迁出的细胞活性好,接

本文2000年12月20日收到,2001年6月11日接受。

本课题承复旦大学医学院神经生物学国家重点实验室、中科院上海生理所开放实验室资助,课题号010113。