文章编号:1000-5404(2010)08-0823-03

论著

胸腺肽促进人脐静脉血管内皮细胞增殖及合成 VEGF 的初步研究

田尚昆,陶小红,向洪洲,王元虎 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院消化内科)

[摘要] **目的** 探讨胸腺肽(thymosinα1,Tα1)对促进人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical veinvessel endothelial cells, HUVECs)增殖的影响以及刺激血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的合成情况。**方法** 体外培养 HUVECs 细胞系,采用四甲基偶氮唑蓝法(MTT)法测定 HUVECs 的增殖情况,以流式细胞仪检测细胞周期,Western blot 检测 VEGF 在HUVECs 的合成。**结果** 浓度为 2.5、5、10 μg/ml 的 Tα1 作用于 HUVECs 后,其对应的 D(492)值、增殖率分别为(0.498 ± 0.027)、(96.2 ± 4.5)%,(0.737 ± 0.018)、(182.0 ± 5.8)%,(0.745 ± 0.021)、(185.0 ± 6.2)% 与对照组比较,明显增高($P<0.01$)。S 期细胞增多。Western blot 检测结果显示实验组 VEGF 条带灰度值/内参灰度值(0.29 ± 0.01)与对照组(0.12 ± 0.06)相比,显著上升($P<0.05$)。**结论** Tα1 能促进 HUVECs 的增殖及增强血管内皮细胞内 VEGF 的合成和分泌,在创伤组织修复过程中可能发挥促新生血管形成的作用。

[关键词] 胸腺肽;血管内皮细胞;血管内皮细胞生长因子;细胞增殖
[中图法分类号] R322.123;R329.28;R341.6 [文献标志码] A

Thymosin α1 increases proliferation and VEGF synthesis in human umbilical vein vessel endothelial cells *in vitro*

Tian Shangkun, Tao Xiaohong, Xiang Hongzhou, Wang Yuanhu (Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of thymosin α1 on the proliferation of human umbilical veinssel endothelial cells (HUVECs) and synthesis of vascular endothelial growth factor (VEGF). **Methods** HUVECs (ECV-304) were cultured with the treatment of 100 μl thymosin α1 at 0, 5 or 2.5 μg/ml for 1 d *in vitro*. The proliferation of HUVECs were measured with MTT assay, cell cycle was tested with flow cytometry and the synthesis of VEGF was detected with Western blot analysis. **Results** Thymosinal promoted the proliferation of HUVECs, and the cells in S-phase was increased, and obviously promoted the synthesis of VEGF. **Conclusion** Thymosin α1 promotes the proliferation of HUVECs and increases the synthesis of VEGF in HUVECs, and may have the effect of increasing the angiogenesis in the process of wound tissue.

[**Key words**] Thymosin α1; human umbilical vein vessel endothelial cell; vascular endothelial growth factor; cell proliferation

Corresponding author: Tao Xiaohong, E-mail: wangjianjun531@153.com

胸腺素(thymosin,TeL)由 28 个氨基酸组成,等电点为 4.2,相对分子质量为 3 108。TeL 是一种高度保守的免疫活性肽,广泛分布于哺乳动物的各个组织器官中。胸腺肽(thymosin α1,Tα1)是胸腺素中的高端产品,为一种生物反应调节剂,具有刺激细胞免疫和体液免疫的作用。胸腺素除了能降低炎症反应,抑制一些上皮细胞的凋亡外,还能通过促进血管内皮细胞增殖、迁移,促进毛细血管生成和创伤愈合,在医学治疗疾病中大有潜力[1-3]。新生血管形成,恢复创伤组织的血液供应,是影响创伤组织愈合最主要的因素之一。血管内皮细胞在血管新生中发挥着重要作用[4]。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)是目前已知最强的血管生长因子,能促进内皮细胞增殖、迁移,增强内皮细胞通透性,促进新生血管形成[5-8]。本研究观察胸腺肽对人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical veinvessel endothelial cells,

[通信作者] 陶小红, E-mail: wangjianjun531@153.com

HUVECs)增殖以及对合成 VEGF 的影响,探讨胸腺肽在创伤组织修复中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料

胰蛋白酶(Sigma 公司),DMEM/F12(HyClone 公司)、胎牛血清(PAA 公司)、MTT(Amresc 公司),人胸腺肽(赛生药业公司),兔抗磷酸化 VEGF/VEGF-WESTERNBLOT 检测试剂盒(Boster 公司),倒置相差显微镜(Leica 公司),BD-RAD 型酶标仪等。

1.2 实验方法

1.2.1 HUVECs 的培养 HUVECs 的体外培养采用 HUVECs 细胞系(ECV-304),按常规方法复苏[9],培养液为含 10% FBS、青霉素 100 U/ml 和链霉素 100 U/ml 的 DMEM/F12,于 37 ℃,5% CO_2 培养箱中培养,待细胞长满后,用胰蛋白酶工作液消化并传代,2 ~3 d 传代 1 次,经细胞形态学鉴定后,取第 3 代细胞用于后续实验。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖水平 当细胞传至第 3 代时进行分组,将细胞悬液以 10^4/孔接种于 96 孔培养板中,采用 MTT 法,设 1 个对照组,3 个实验组,每组 5 个复孔。对照组加入 100 μl RPMI1640 培养液,3 个实验组分别加入含 10、5、2.5 μg/ml 胸腺肽的 100 μl 培养液。于 37 ℃,5% CO_2 的条件下孵育 20 h。然后每孔加入 MTT 溶液(5 mg/ml) 20 μl,继续孵育 4 h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入 15 μl DMSO,振荡 10 min,选择 492 nm 波长,在酶标仪上测定各孔光密度值[D(492)],各组分别以对应的空白对照组 D(492)值平均值调零,记录结果。

细胞增殖率 = [实验组 D(492) − 对照组 D(492)]/对照组 D(492) ×100%

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期变化 收集对数生长期的 HUVECs,以 10^5/ml 接种于 100 ml 培养瓶中,孵育 24 h。依据 MTT 结果,实验组加入 5 μg/ml 胸腺肽,对照组加等量 PBS,培养 24 h 后,取出各组细胞,PBS 冲洗 2 次,消化,离心。将处理后的细胞悬液快速装入预冷的 1 ml 75% 乙醇的 EP 管中,4 ℃过夜。将等体积的细胞悬液和碘化丙啶(PI)混合,于 4 ℃下放置 25 min。混合液以尼龙网去除杂质。将样品放入流式细胞仪测定,所得数据输入计算,并用 Modifit 软件分析细胞周期分布。

1.2.4 Western blot 检测 VEGF 蛋白表达 接种于细胞培养皿的 HUVECs (5×10^5个)用 PBS 洗涤后,加入 10 μl 蛋白酶抑制剂(400 μmol/L)PMSF,用 RIPA 细胞裂解液 400 μl[50 mmol/L Tris · HCl (pH 8.0)、150 mmol/L NaCl、0.2 g/L NaN_3、1 g/L SDS、10 ml/L NP240、5 g/L 去氧胆酸钠、0.1 mmol/L 钒酸钠及 1 mmol/L 氟化钠]冰上裂解 20 min, 12 000 r/min 离心10 min,提取细胞总蛋白,并以 BCA 蛋白定量法定量。磷酸化 VEGF 的表达量采用 Western blot 法检测。取 50 μg 总蛋白加入上样缓冲液,于 100 ℃加热 5 min,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。转膜后,用5% 的 BSA 室温下封闭 1 h,依次加入 1∶1 000 兔抗 VEGF 磷酸化抗体(4 ℃,过夜)、1∶2 000 碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG(37 ℃,1 h),最后用化学发光试剂显色,每组重复 3 次。用北航 CM22000B 生物医学图像分析系统,对目的条带进行扫描和密度分析。

1.3 统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,多组间比较行方差分析,两组比较行 t 检验。

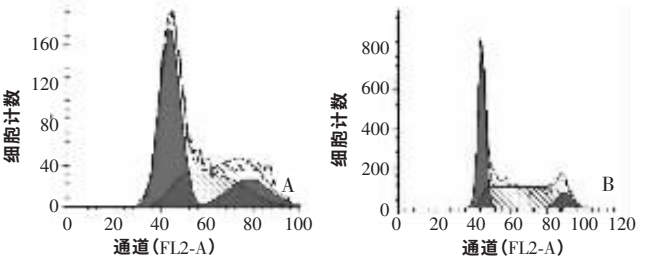
2 结果

2.1 不同浓度胸腺肽对血管内皮细胞的增殖作用

MTT 显示对照组加入 100 μl RPMI1640 培养液 D(492)值为(0.254 ±0.013),实验组分别加入浓度为 2.5、5、10 μg/ml Tα1 100 μl 作用于 HUVECs 后,其对应的 D(492)值、增殖率分别为(0.498 ± 0.027)、(96.2 ± 4.5)%,(0.737 ± 0.018)、(182.0 ±5.8)%,(0.745 ±0.021)、(185.0 ±6.2)%,经统计学分析差异有统计学意义($P<0.01$),提示一定浓度的胸腺肽对血管内皮细胞有明显增殖作用。

2.2 流式细胞仪检测细胞周期

对照组 S 期细胞占 30.47%,G_2/G_1 为 1/1.78;实验组 S 期细胞占 49.76%,G_2/G_1 为 1/1.99,实验组 S 期细胞较对照组明显增多(图 1),说明胸腺肽促进细胞增殖。

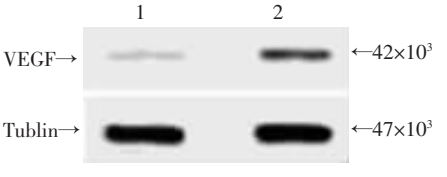


A:对照组;B:实验组

图 1 胸腺肽作用于血管内皮细胞后细胞周期的变化

2.3 Western blot 检测结果

实验组的 VEGF 条带灰度值/内参灰度值(0.29 ±0.01)与对照组(0.12 ±0.06)相比显著上升 ($P<0.05$),提示 Tα1 能显著促进 VEGF 在血管内皮细胞内合成。见图 2。



1:对照组; 2:实验组

图 2 Western blot 检测 VEGF 在血管内皮细胞中的表达

3 讨论

胸腺肽是胸腺组织分泌的具有高度免疫活性的一组多肽,是应用较早的生物反应调节剂,它通过连续诱导T细胞分化、发育的各个阶段,维持机体免疫平衡状态,增强T细胞对抗原的反应,从而提高机体抵抗疾病的能力[10]。胸腺肽包含多种激素,主要活性成分是由28个氨基酸组成的Tα1,该激素具有调节和增强人体细胞免疫功能的作用,能促使分裂原激活后的外周血中的T细胞成熟,增强T细胞在各种抗原或致有丝分裂原激活后各种淋巴因子(白介素-2、白介素-3、干扰素)的分泌,增强T细胞上淋巴因子的受体水平[1-4]。Tα1通过对T4辅助细胞的激活作用以达到增强淋巴细胞反应的目的[9]。近年来研究发现,胸腺肽还能影响细胞的生长迁移,而且在血管再生、创伤愈合以及免疫和炎症反应均有作用[10-16],为一些疾病的诊治提供了新的研究思路。现临床常用于治疗各种原发性或继发性T细胞缺陷病,某些自身免疫疾病,各种免疫功能低下的疾病等。大量实验证实,恢复创伤组织的血液供应是影响组织修复的主要因素以及VEGF是内皮细胞特异的丝裂原,在血管形成,维持血管内皮的整体性、通透性有极其重要的作用[5-8]。本实验以一定浓度胸腺肽作用于脐静脉血管内皮细胞,观察其在促进细胞增殖以及创伤修复方面的作用。MTT法检测到不同浓度下胸腺肽明显促进脐血管内皮细胞增殖;流式细胞仪检测技术观察到加胸腺肽后的血管内皮细胞S期(合成期)细胞明显增多,G_2(合成后期)/G_1(合成前期)增加;Western blot检测到胸腺肽显著增强VEGF在血管内皮细胞中的合成。本实验证实,胸腺肽明显促进脐血管内皮细胞增殖,通过促进血管内皮细胞增殖从而达到修复组织创伤的目的。由此可以推导,当炎症、免疫疾病等破坏胃肠道内皮细胞引起出血时,可以尝试通过注射胸腺肽,以促进血管内皮细胞增殖、迁移,从而达到修复的目的。本方法尚处于实验的探索阶段,只进行了体外实验,体内实验有待进一步研究。

参考文献:

[1] Malinda K M, Goldstein A L, Kleinman H K. Thymosin beta 4 stimulates directional migration of human umbilical vein endothelial cells [J]. FASEB J, 1997, 11(6): 474-481.

[2] Bock-Marquette I, Saxena A, White M D, *et al*. Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair[J]. Nature, 2004, 432(7016): 466-472.

[3] Philp D, Goldstein A L, Kleinman H K. Thymosin beta4 promotes angiogenesis, wound healing, and hair follicle development[J]. Mech Ageing Dev, 2004, 125(2): 113-115.

[4] 李悦山, 张建龙, 薛磊. 黄芪与当归对人脐静脉内皮细胞增殖及VEGF表达的影响[J]. 新疆医科大学学报, 2005, 28(3): 224-227.

[5] Zhang Q X, Magovern C J, Mack C A, *et al*. Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis[J]. J Surg Res, 1997, 67(2): 147-154.

[6] 李竹林, 朱明才, 董蒲江. 结肠癌中VEGF-D和uPA的表达与侵袭转移的关系[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(22): 2146-2149.

[7] 董晓灵, 王曙光, 张玉君, 等. VEGF对大鼠50%肝脏移植术后血清HGF、IL-6浓度的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(11): 1037-1039.

[8] 赵刚, 黄岚, 宋耀明, 等. 血管内皮生长因子基因修饰内皮祖细胞对内膜损伤血管修复的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(5): 427-430.

[9] 斯佩克特. 细胞试验指南: 下册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 16.

[10] 贾琪, 华子春. 人胸腺肽β4基因在大肠杆菌中的克隆、表达、纯化及促血管生成生物活性研究[J]. 东南大学学报: 医学版, 2007, 26(4): 295-298.

[11] Grunberg E, Eckert K, Maurer H R, *et al*. Prothymosin alpha1 effects on IL-2-induced expression of LFA-1 on lymphocytes and their adhesion to human umbilical vein endothelial cells[J]. J Interferon Cytokine Res, 1997, 17(3): 159-165.

[12] Chen Y, Zhao L, Shen G, *et al*. Expression and analysis of thymosin alpha1 concatemer in *Escherichia coli*[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2008, 49(Pt 1): 51-56.

[13] Koutrafouri V, Leondiadis L, Avgoustakis K, *et al*. Effect of thymosin peptides on the chick chorioallantoic membrane angiogenesis model [J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1568(1): 60-66.

[14] Chen P F, Zhang H Y, Fu G F, *et al*. Overexpression of soluble human thymosin alpha 1 in *Escherichia coli*[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2005, 37(2): 147-151.

[15] 唐博, 罗文军, 严润彬, 等. 肝细胞生长因子促血管内皮细胞增殖及迁移的研究[J]. 重庆医科大学学报, 2005, 30(1): 85-88.

[16] 唐军, 刘平羽, 周鸣. 胸腺肽联合化疗改善胃肠道恶性肿瘤患者的细胞免疫功能[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2009, 29(11): 1588-1590.

(**收稿**:2009-10-14;**修回**:2009-11-19)

(编辑 龙 亮)