文章编号:1000-5404(2010)21-2307-04

论著

转化生长因子-β1促血管内皮细胞向间质细胞转化的作用研究

简 宇[1],简华刚[1],黄 宏[2],徐 祥[2],郭 敏[1],代 卉[2],崔文慧[2],蒋建新[3],朱佩芳[3],王正国[3] (400016 重庆,重庆医科大学附属第二医院创伤烧伤科[1];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室:第一研究室[2],第四研究室[3])

【摘要】 目的 观察转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1,TGF-β1)促进内皮细胞向间质细胞转化[endothelial-mesenchymal (myofibroblast) transition,EnMT]的效应,探讨肌成纤维细胞的来源以及纤维化疾病发生的新机制。方法 分离培养人脐静脉内皮细胞,采用不同浓度的TGF-β1(0、10、25、和50 ng/ml)刺激细胞72 h后,倒置显微镜观察诱导后细胞形态变化,免疫荧光方法检测第Ⅷ因子相关抗原和α-SMA表达变化,RT-PCR检测VE-钙粘蛋白(VE-Cadherin),α-SMA和Ⅰ型胶原基因表达变化。结果 正常对照组内皮细胞呈铺路石样生长,TGF-β1刺激组内皮细胞由铺路石样形态向梭形转化。免疫荧光检测可见对照组含有少量FⅧ,α-SMA双阳性细胞。TGF-β1组FⅧ,α-SMA双阳性细胞明显增多,并且具有明显的浓度依赖性($P<0.05$,$P<0.01$)。RT-PCR检测结果显示,TGF-β1刺激导致内皮细胞特异性标记物VE-钙粘蛋白(VE-cadherin)基因的表达显著减少($P<0.05$),随着TGF-β1刺激浓度的增加,VE-钙粘蛋白基因表达呈明显的下降趋势;相反,内皮细胞间质性标记物α-SMA和Ⅰ型胶原基因的表达显著增加($P<0.05$,$P<0.01$),并且具有明显的浓度依赖性。结论 TGF-β1刺激内皮细胞后,细胞表型和功能均表现为间质细胞特性,提示TGF-β1具有促进内皮细胞向间质细胞转化(EnMT)的作用,并且其促EnMT效应具有明显的浓度依赖性。

【关键词】 内皮细胞;肌成纤维细胞;转分化;转化生长因子-β1
【中图法分类号】 R322.12;R329.24;R341 **【文献标志码】** A

Role of TGF-β1 in promoting transformation of intravascular endothelial cells into interstitial cells

Jian Yu[1], Jian Huagang[1], Huang Hong[2], Xu Xiang[2], Guo Min[1], Dai Hui[2], Cui Wenhui[2], Jiang Jianxin[3], Zhu Peifang[3], Wang Zhengguo[3] ([1]Department of Burns, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department 1, [3]Department 4, State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

【Abstract】 Objective To observe the role of TGF-β1 in promoting transformation of endothelial cells into interstitial cells and study the source of myofibroblasts and the mechanism underlying fibrosis. Methods Endothelial cells were isolated from human umbilical vein and cultured with different concentrations of TGF-β1 (0, 10, 25 and 50 ng/ml) for 72 h. Then, changes of cell morphology were observed under an inverted phase contrast microscope. Expression of factor Ⅷ related antigen and α-Smooth muscle actin (α-SMA) was detected by immunofluorescence assay. Expression of VE-Cadherin, α-SMA and type 1 collagen was detected by RT-PCR. Results A paving stone-like growth and a spindle-like growth of endothelial cells was observed in control group and TGF-β1 stimulating group, respectively. Immunofluorescence assay showed a small number of factor Ⅷ and α-SMA positive cells in control group. The number of factor Ⅷ and α-SMA positive cells was significantly greater in TGF-β1 group than in control group ($P<0.05$) and increased with the concentration of TGF-β1. RT-PCR showed that the expression level of VE-Cadherin significantly decreased with the concentration of TGF-β1 ($P<0.05$) while the expression level of α-SMA and type 1 collagen significantly increased with concentration of TGF-β1 ($P<0.05$). Conclusion TGF-β1 promotes the transformation of endothelial cells into interstitial cells in a concentration-dependent manner.

【Key words】 endothelial cell; myofibroblast; transformation; TGF-β1

Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China (973 Program, 2005CB522603) and the National Natural Science Foundation of China (3871025). Corresponding author: Jian Huagang, E-mail: hgjian@sohu.com; Huang Hong, huanghongcq@163.com

【基金项目】 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2005CB522603);国家自然科学基金(30871025)
【通信作者】 简华刚,E-mail:hgjian@sohu.com
黄 宏,E-mail:huanghongcq@163.com

组织/器官纤维化疾病仍然是现代医学尚未解决的临床难题，是人类致死和致残的主要原因之一。随着对纤维化疾病相关细胞和分子机制的深入研究，已经肯定肌成纤维细胞是其主要效应细胞[1]，但其来源和产生机制仍不十分清楚。目前研究认为血管内皮细胞(endothelial cell，EC)向间质纤维细胞转分化[endothelial-mesenchymal (myofibroblast) transition，EnMT]是纤维化组织/器官肌成纤维细胞来源的重要机制之一[2-5]。作为强效的致纤维化因子TGF-β1可能对这一转化过程起着决定性作用，为此，本研究欲探讨不同浓度TGF-β1对内皮细胞的促EnMT效应以及细胞表型和功能的变化，为TGF-β1在EnMT过程中的作用提供有力的实验依据，同时，也可能为组织/器官纤维化防治提供新的理论依据和治疗手段。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

M199培养基购自美国HyClone公司，优质胎牛血清购自美国HyClone公司，TGF-β1、Ⅳ型胶原酶和Hochest33342购自美国Sigma公司，胰蛋白酶购自美国Gibco公司，兔抗人Ⅷ因子相关抗原(Ⅷ-R Ag)多克隆抗体、鼠抗人α-SMA多克隆抗体、FITC标记山羊抗兔IgG、罗丹明标记山羊抗小鼠IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司，RT试剂盒购自东洋纺(上海)生物科技有限公司，PCR试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 HUVECs的分离及原代培养

脐带由第三军医大学大坪医院妇产科提供，在无菌条件下，取健康产妇正常分娩新生儿脐带15～20 cm，4 ℃保存不超过3 h，剪去两端各0.5 cm，在脐静脉一端插入16号针头并固定，用冷生理盐水灌洗3次至流出液清亮，用止血钳夹住脐带的另一端，灌入37 ℃预热的0.1% Ⅳ型胶原酶和0.25% 胰蛋白酶混合消化液(1∶1)，使之充盈，37 ℃孵育12～15 min后，用含有牛血清白蛋白的培养基中和多余的酶，并冲洗2次，收集中和液和冲洗液于离心管中，以1 000 r/min离心7 min。弃上清，加入细胞培养液重悬细胞并接种于预先用1%明胶包被的25 cm^2塑料培养瓶中和置有预先用1%明胶包被的盖玻片的6孔板内，置37 ℃、5% CO_2饱和湿度细胞培养箱中。12 h后除去未贴壁的细胞以及红细胞，更换新鲜培养液，加入VEGF致终浓度10 ng/ml。以后每隔2～3 d换液1次。待细胞生长融合80%以上，加入0.25% 胰蛋白酶溶液消化，传代。

1.3 HUVECs的鉴定

6孔板内盖玻片的原代和传代内皮细胞经FⅧ因子免疫荧光鉴定。待细胞生长状态呈鹅卵石样时取出盖玻片，PBS洗3次×5 min，4%多聚甲醛固定15 min，PBS洗3次×5min，0.3% Triton X-100 37 ℃孵育10 min，PBS洗3次×5 min，山羊血清37 ℃封闭30 min，倾去多余封闭液，一抗兔抗人第Ⅷ因子单克隆抗体(1∶75，阴性对照用PBS代替一抗)4℃孵育过夜，PBS振洗3次×5 min，二抗FITC标记的山羊抗兔IgG(1∶75)37 ℃避光孵育30 min，PBS振洗3次×5 min，10 μg/ml的Hoechst33342染液37 ℃避光孵育10 min，PBS洗3次×5 min，50%甘油PBS封片，荧光显微镜下观察。在随机选取10个视野(×400)，计算FⅧ阳性细胞率。

FⅧ因子阳性细胞数=FⅧ因子阳性细胞数/核个数×100%

1.4 细胞分组与TGF-β1刺激

取3～5代HUVECs用于实验，以1×10^5/ml接种于预先用1%明胶包被的盖玻片上，在12孔培养板中爬片培养；同时接种于6孔培养板，待细胞生长到80%融合后，细胞分成4组：分别为TGF-β1不同浓度梯度组(10、25、50 ng/ml)和对照组(为不加TGF-β1组，即0 ng/ml)，继续培养72 h，收获细胞。

1.5 免疫荧光检测第Ⅷ因子和α-SMA蛋白表达

免疫荧光双染检测试验方法同脐静脉内皮细胞第Ⅷ因子相关抗原免疫荧光检测试验方法，一抗为兔抗人第Ⅷ因子多克隆抗体和鼠抗人α-SMA单克隆抗体(抗体稀释浓度都为1∶75，阴性对照用PBS代替一抗)，二抗为FITC标记的山羊抗兔IgG和罗丹明标记山羊抗鼠IgG(抗体稀释浓度都为1∶75)。

1.6 RT-PCR检测HUVECs的VE-钙粘蛋白(VE-Cadherin)，α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)和Ⅰ型胶原基因表达

采用用硫氰酸胍-酚-氯仿一步抽提法(Trizol，美国Gibco公司)提取细胞的总RNA(或采用异硫氰酸胍一步分离法提取)。应用软件Primer Premier 5.0设计扩增引物。以三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参照，其余VE-Cadherin P1：5′-ACATCACAGTCAAGTATGGGC-3′，P2：5′-GATGCAGAGTAAGATGGCTGC-3′，PCR产物为230 bp；α-SMA P1：5′-TTCAATGTCCCAGCCATGTA-3′，P2：5′-GAAGGAATAGCCACGCTCAG-3′，PCR产物为240 bp；Ⅰ型胶原P1：5′-CCAAATCTGTCTCCCCAGAA-3′，P2：5′-TCAAAAACGAAGGGGAGATG-3′，大小为214 bp；GAPDH P：5′-GGCAAATTCCATGGCACCGTC-3′，P2：5′-TTCTAGACGGCAGGTCAGGTC-3′，PCR产物为591 bp。扩增产物用1×电泳缓冲液Tris-乙酸制备2%琼脂糖凝胶，加入浓度为0.5μg/ml的溴化乙锭，取10 μl PCR产物，5 μl DNA标志物上样，恒压5 V/cm电泳，然后用凝胶扫描仪观察并扫描。实验结果应用LabWorks 4.6软件系统进行电泳条带分析，以目的条带与GAPDH条带的总灰度值的比值作为检测目的片段的相对值。

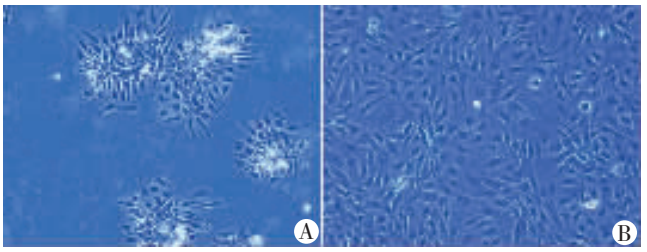
1.7 统计学方法

计量资料以$\bar{x} \pm s$表示，采用SPSS 11.0统计软件，组间比较行t检验。

2 结果

2.1 HUVECs形态学观察及鉴定

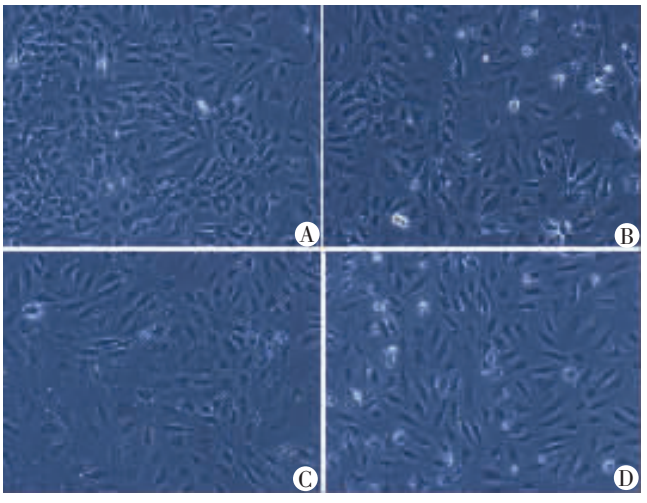
2.1.1 倒置显微镜观察 原代HUVECs在倒置显微镜下部分早期呈短梭形或多边形，边界清楚，细胞呈克隆性生长，8～10 d融合。传代后细胞生长旺盛，3～5 d融合成典型的“铺路石”样(图1)。



A:原代;B:第 3 代 HUVECs

图 1　原代和传代 HUVECs 形态观察　(倒置显微镜×100)

2.1.2　TGF-β1 对细胞形态的影响　　倒置显微镜下可见对照组培养细胞呈铺路石样;TGF-β1 组细胞培养 72 h 后,细胞形态发生了明显变化,部分细胞逐渐由铺路石样转变为梭形,同时细胞之间间隙变大,表现为细胞分离,并且这种细胞离散随着刺激浓度逐渐而明显。10 ng/ml 组部分内皮细胞呈长梭形形态,漩涡状生长;50 ng/ml 组几乎所有细胞胞体增大,呈明显宽大梭形形态,细胞间连接减少、离散;25 ng/ml 组内皮细胞形态变化介于 10 ng/ml 和 50 ng/ml 组之间(图 2)。



A:对照组;B:10 ng/ml TGF-β1 组;C:25 ng/ml TGF-β1 组;D:50 ng/ml TGF-β1 组

图 2　不同浓度 TGF-β1 分别刺激 HUVECs 72 h 后,对照组和 TGF-β1 组细胞形态　(倒置显微镜×100)

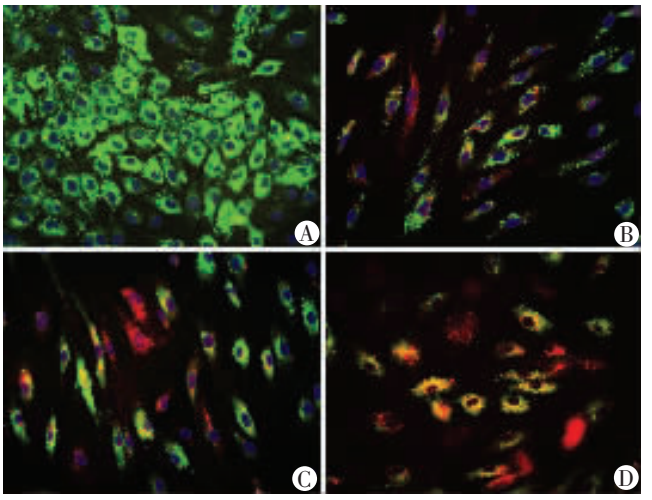
2.1.3　第Ⅷ因子相关抗原免疫荧光染色鉴定　　原代 HUVECs 和传代细胞第 1、2、3、4 代 HUVECs 第Ⅷ因子相关抗原阳性率分别为(0.837±0.002)%、(0.854±0.004)%、(0.872±0.009)%、(0.908±0.003)%、(0.959±0.004)%。

2.2　免疫荧光双染结果

第Ⅷ因子是内皮细胞的特异性标记物,α-SMA 则通常是表达于基质细胞的标记物。细胞分组培养 72 h 后,对照组极少量表达 FⅧ、α-SMA 的双阳性细胞。TGF-β1 组 FⅧ、α-SMA 双阳性细胞明显增多,并且随着 TGF-β1 浓度的增加,双阳性细胞率具有明显的增加趋势($P<0.05$,$P<0.01$)(图 3,4)。

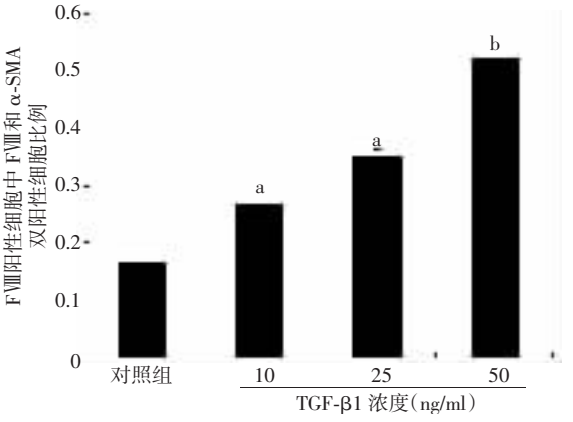
2.3　VE-cadherin、α-SMA 和Ⅰ型胶原的 mRNA 表达

不同浓度 TGF-β1(10、25、50 ng/ml)刺激分离培养的 HUVECs 72 h 后,EC 的特异性标记物 VE-cadherin 基因表达显著减少($P<0.05$),并且随着 TGF-β1 浓度的增加其表达呈明显的下降趋势;相反 α-SMA 和Ⅰ型胶原基因表达显著增加($P<0.05$,$P<0.01$)(图 5,表 1),并且有明显的浓度依赖性。此外,正常对照组 HUVECs α-SMA 和Ⅰ型胶原基因也低水平表达。



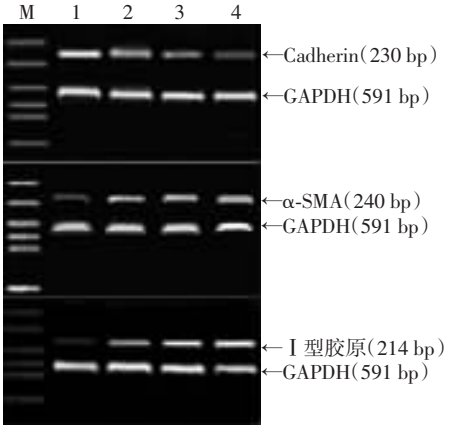
A:对照组;B:10 ng/ml TGF-β1 组;C:25 ng/ml TGF-β1 组;D:50 ng/ml TGF-β1 组

图 3　不同浓度 TGF-β1 分别刺激 HUVECs 72h,HUVECs FⅧ(绿色荧光)和 α-SMA(红色荧光)表达变化　(荧光显微镜×400)



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图 4　不同浓度 TGF-β1 分别刺激 HUVECs 72 h,FⅧ、α-SMA 双表达阳性细胞在 FⅧ表达细胞中的比例



M:标准;1:对照组;2:10 ng/ml TGF-β1 组;3:25 ng/ml TGF-β1 组;4:50 ng/ml TGF-β1 组

图 5　RT-PCR 检测 TGF-β1 刺激 HUVEC 细胞 72 h 后 VE-cadherin,α-SMA 和Ⅰ型胶原基因的表达

表1 TGF-β1刺激HUVEC细胞72 h后VE-cadherin，α-SMA和Ⅰ型胶原基因的表达变化（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	VE-Cadherin	α-SMA	Ⅰ型胶原
对照组	0.81±0.03	0.17±0.07	0.17±0.08
10 ng/ml TGF-β1组	0.64±0.08[a]	0.35±0.13[a]	0.48±0.08[a]
25 ng/ml TGF-β1组	0.56±0.06[a]	0.41±0.07[a]	0.65±0.04[b]
50 ng/ml TGF-β1组	0.38±0.04[a]	0.53±0.02[b]	0.77±0.10[b]

a $P<0.05$，b $P<0.01$，与对照组比较

3 讨论

研究证实，在胚胎发育过程中和生后病理情况下，血管内皮细胞（endothelial cell，EC）具有向间质纤维细胞分化的能力[2,6]，内皮细胞-间质细胞转化［Endothelial-mesenchymal（myofibroblast）transition，EnMT］是指内皮细胞向间质细胞转化[7]，其表型和功能发生明显改变。即内皮细胞丧失特异性标记物表达，如VE-cadherin、Tie-1/2、VEGFR 1/2 、PECAM/CD31和FⅧ，转而表达间质细胞特异性标记物，如表达α-SMA、Ⅰ型和Ⅲ型胶原、波形蛋白和calponin，并获得较强的增殖和迁移能力。研究证实在脊椎动物的心血管系统发育过程中就普遍存在EnMT现象，EnMT是心血管发育的关键事件[8]。胚胎发育早期，心内膜细胞、主动脉和肺动脉的内皮下间隙细胞最初也表达内皮细胞标记物，如VE-cadherin、Tie-1/2、VEGFR 1/2和PECAM/CD31，后期通过EnMT形成间质细胞，丧失内皮细胞标记物，转而表达α-SMA。出生后，机体在应激如创伤、尤其是炎症等情况下这种转化仍然存在[9]。

本研究采用分离培养的成熟人脐静脉内皮细胞（HUVEC）作为实验对象。观察强效致纤维化因子TGF-β1对内皮细胞的促EnMT效应。首先，实验观察了TGF-β1对内皮细胞形态的影响，在TGF-β1作用下，细胞由铺路石样形态向梭形形态转化，同时细胞之间的连接减少，细胞间隙变大，与此同时，免疫荧光染色显示对照组含有少量α-SMA，FⅧ双阳性细胞，TGF-β1组α-SMA，FⅧ双阳性细胞明显增多，并且具有明显的浓度依赖性。对转化细胞基因检测显示，细胞的功能也发生了明显的改变，随着TGF-β1的浓度增加，不仅VE-cadherin基因的表达呈显著减少趋势，α-SMA基因的表达呈明显增长趋势，并且细胞还具有合成Ⅰ型胶原的功能。这些实验结果与文献[2,7]报道的结果是一致的，由此提示TGF-β1具有促进内皮细胞向间质细胞，尤其是肌成纤维细胞转化的作用，其促转化作用具有明显的浓度依赖性。

该实验结果提示内皮细胞可能成为纤维化组织中的肌成纤维细胞的重要来源之一，因此维持稳定的内皮细胞形态及功能可阻断肌成纤维细胞来源，延缓和抑制纤维化进程；另一方面，我们在动员骨髓内皮祖细胞（EPC）以及促进局部血管内皮细胞增殖参与损伤组织/器官重建血管时[10,11]，是否应该考虑到修复微环境的状态？例如，如果存在高水平的TGF-β1对内皮细胞表型和功能的影响，可能促进了纤维化的发生。

参考文献：

[1] Kisseleva T, Brenner D A. Mechanisms of Fibrogenesis[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2008, 233(2): 109-122.

[2] Zeisberg E M, Tarnavski O, Zeisberg M, *et al*. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis[J]. Nat Med, 2007, 13(8): 952-961.

[3] Zeisberg E M, Potenta S E, Sugimoto H, *et al*. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge *via* endothelial-to-mesenchymal transition[J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(12): 2282-2287.

[4] Potenta S, Zeisberg E, Kalluri R. The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression[J]. Br J Cancer, 2008, 99(9): 1375 1379.

[5] Li J, Qu X, Bertram J F. Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. Am J Pathol, 2009, 175(4): 1380-1388.

[6] Karasek M A. Does transformation of microvascular endothelial cells into myofibroblasts play a key role in the etiology and pathology of fibrotic disease?[J]. Med Hypotheses, 2007, 68(3): 650 655.

[7] Goumans M J, van-Zonneveld A J, ten-Dijke P. Transforming growth factor beta induced endothelial-to-mesenchymal transition: a switch to cardiac fibrosis?[J]. Trends Cardiovasc Med, 2008, 18(8): 293 298.

[8] Liebner S, Cattelino A, Gallini R, *et al*. Beta-catenin is required for endothelial-mesenchymal transformation during heart cushion development in the mouse[J]. J Cell Biol, 2004, 166(3): 359 367.

[9] Chaudhuri V, Zhou L, Karasek M. Inflammatory cytokines induce the transformation of human dermal microvascular endothelial cells into myofibroblasts: a potential role in skin fibrogenesis[J]. J Cutan Pathol, 2007, 34(2): 146-153.

[10] Musri M M, Diez M, Barbera J A, *et al*. Circulating vascular progenitor cells undergo endothelial to mesenchymal transition mediated by TGFbeta RI[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179: A5358.

[11] 宋仁刚，宋任强，柳大烈，等. 不同浓度TGF-β1对大鼠骨髓内皮祖细胞体外增殖的影响[J]. 第三军医大学学报，2006，28(23)：2306-2308.

（收稿 2010-06-04 修回 2010-09-09）

（编辑 王小寒）