维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)02-0239-04

五羟色胺促进骨髓基质细胞生长初探

易岂建[1], 杨 默[2], 庞雅轩[2], 李桂霞[2], 夏文杰[2], 霍泰辉[2], 宋银子[2]

(1.重庆医科大学儿科学院心内科,重庆 400014;2.香港中文大学儿科系)

【摘 要】目的:探讨五羟色胺(serotonin,5-HT)对骨髓基质细胞(bone marrow stromal cell,BMSC)体外生长的影响。方法:采用骨髓基质细胞集落培养技术(CFU-F)检测不同浓度 5-HT 以及 5-HT 分别与碱性成纤维细胞生长因子(basic-fibroblast growth factor,bFGF),血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor,PDGF),血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)对小鼠及人 BMSC 体外培养的生长促进作用,反转录多聚酶链反应(RT-PCR)检测人 BMSC 表面 5-HT2 型受体 mRNA 表达。结果:5-HT 不同浓度(50,100,200,500nM)对小鼠及人 BMSC 体外培养均有生长促进作用($P<0.05$),显示最大作用浓度为 200nM。5-HT 可增强 bFGF,PDGF 和 VEGF 对 BMSC 生长促进作用。人 BMSC 表面有 5-HT2A,2B,2C 受体 mRNA 表达。结论:5-HT 具有 BMSC 生长促进作用,并可增强 bFGF,PDGF,VEGF 促进 BMSC 的生长,其作用途径可能通过 BMSC 表面 5-HT2 型受体,从而促进细胞生长。

【关键词】五羟色胺;骨髓基质细胞;受体

【中国图书分类法分类号】R322.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-06-18

Serotonin stimulates the growth of bone marrow stromal cells

YI Qijian, et al

(*Department of Cardiovascular Diseases, College of Pediatrics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of 5-hydroxytryptamine(5-HT) on proliferation of bone marrow stromal cells(BMSCs) in vitro. *Methods*: Murine BMSCs colony-forming unit assay and human bone marrow mononuclear cells count assay were used respectively to determine the effect on proliferation of BMSCs with different dose 5-HT(0,50,100,200,500nM) and 5-HT combined with basic fibroblast growth factor(bFGF), platelet-derived growth factor(PDGF), and ventricular endothelial growth factor (VEGF). Reversal transcript polymerase chain reaction(RT-PCR) was used to detect expression of mRNA of 5-HT2 receptor subtypes. *Results*: The results showed that 5-HT significantly stimulated murine colony-forming unit formation(CFU-F) proliferation in a dose-dependent manner(50 to 500nM) using murine bone marrow cells($n=3$). Maxmum stimulation was obtained with 200nM of 5-HT($P=0.03$). The effect of 5-HT on murine CFU-F proliferation was compared with that of bFGF, PDGF and VEGF at their optimal dose. The stimulating activity of 5-HT was the same as that of PDGF and VEGF, but lower than that of bFGF. A significantly enhancing effect was observed in 5-HT plus bFGF, PDGF, and VEGF, respectively. We also found that 5-HT, or 5-HT plus bFGF, PDGF, and VEGF had similar effect on human bone marrow stromal cells proliferation. There were expression of mRNA of 5-HT 2A, 2B and 2C receptor subtypes on human bone marrow stromal cells. *Conclusion*: These data indicate that 5-HT has a significant mitogenic effect on BMSCs in vitro and enhance proliferating effect of bFGF, PDGF, and VEGF on BMSCs. This effect of 5-HT on BMSCs appears to be mediated via 5-HT2 receptor subtypes.

【Key words】5-HT; Bone marrow stromal cell; Receptor

五羟色胺(serotonin,5-HT)是分子量为 176.2 道尔顿的单胺。已报道 5-HT 对平滑肌细胞和成纤维细胞有生长促进作用[1]。近来,5-HT 被认为不仅是神经递质和血管活性因子,而且还可作为生长因子,它代表了一类通过 G 蛋白结合受体相互作用,而促进细胞分裂的分子[2]。我们以前的工作已在国际上首次证明 5-HT 是一个巨核细胞生长因子,可能通过其细胞膜上的 5-HT 受体,促进巨核细胞的生长[3]。然而,5-HT 在造血细胞生长调控的细胞与分子机制尚有待进一步明确。5-HT 对骨髓基质细胞(bone marrow stromal cell,BMSC)的

作者介绍:易岂建(1966-),男,教授,博士,
主要研究方向:小儿心血管疾病诊断治疗新进展。

维普资讯 http://www.cqvip.com

作用还未见报道。近年研究显示 BMSC 在一定条件下可诱导分化为多种组织细胞,为临床许多退行性疾病(如心肌梗死,脑梗死等)的治疗带来希望[4]。本研究拟观察 5-HT 对 BMSC 体外培养生长的影响,以及 BMSC 表面 5-HT 受体的表达。为今后使用 5-HT 诱导 BMSC 的定向分化建立初步基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

5-HT,胎牛血浆(bovine plasm)购自 Sigma,FGF、PDGF、VEGF 购自 Depro Tech(USA)公司,5-HT2A、2B、2C 受体引物由 Life Technologies (Pacific)Ltd 合成。

1.2 小鼠 CFU-F 集落培养

BALB/c 小鼠,雌性,6~10 周龄,由香港中文大学动物中心提供。取出小鼠股骨两端剪开,用 IMDM 培养液将骨髓冲到离心管。骨髓细胞经移液管打匀后,在 22℃,180g 离心 10min。用 IMDM 洗涤 2 次,做细胞计数。

取 2×10^6/mL 细胞,加入直径 35mm 的培养皿。共设 6 组,1 组为空白对照,其余分别加入 0,50,100,200 和 500nmol/L 浓度 5-HT,以及 50ng/ml 的 bFGF,PDGF 和 VEGF,10% 胎牛血清(FCS),适量青霉素和链霉素,加 IMDM,使总体积达 1ml。培养皿置于 37℃,100% 湿度,5% CO_2 培养箱中培养 9 天,粘附细胞用吉姆萨染色,在光镜下计数贴壁生长的细胞集落(colony-forming unit-fibroblastical,CFU-F)。10 个细胞以上的细胞簇为一个集落[5]。

1.3 人 BMSC 细胞培养

抽取健康自愿者骨髓(骨髓移植时的供体),加入 15U/ml 的肝素管中,加 IMDM 等倍稀释,采用 Ficoll-Hypaque (1.077,Sweden)分离单个核细胞,用 IMDM 洗涤 2 次,做细胞计数。2×10^5/ml 单个核加入同样六组培养系统培养 12 天。在倒置显微镜下计数细胞集落(CFU-F),比较不同组别的细胞生长情况。

1.4 人 BMSC 表面 5-HT 受体 mRNA 表达

采用 RT-PCR 方法[8],检测人 BMSC 表面 5-HT2A、2B 和 2C 受体 mRNA 表达,其受体的引物序列分别为:

5-HT2AF 5'-ACTCCAGAACTAAGGCATTT-3'

5-HT2AR 5'-AGCTAATTTGGCCCGTGTGCC-3'

5-HT2BF 5'-ACGTTCTCTTTTCAACCGCA-3'

5-HT2BR 5'-CCGGTGACGAGCAAGGTGTT-3'

5-HT2CF 5'-CCCTGTCTCTCCTGGCAATC-3'

5-HT2CR 5'-TTGTTCACGAACACCTTTTC-3'

1.5 统计学处理

数据以均数±标准差($x\pm s$)表示,采用配用 t 检验进行分析。

2 结 果

2.1 五羟色胺促进小鼠 BMSC 生长

为了解 5-HT 对体外 BMSC 生长的影响,使用小鼠骨髓成纤维细胞集落(CFU-F)培养技术检测五羟色胺(0,50,100,200,500nM)的剂量反应曲线。结果显示 4 个浓度的 5-HT 均有显著促进 CFU-F 生长($P<0.05$, $n=5$),其中 5-HT 最大的作用剂量为 200nmol/L($P=0.03$)(图 1)。

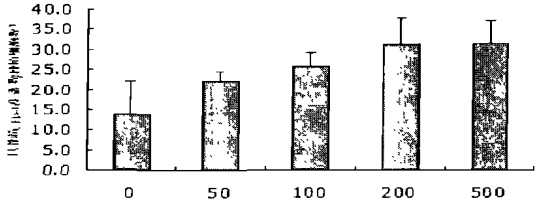


图 1 不同浓度 5-HT 对小鼠 CFU-F 的作用

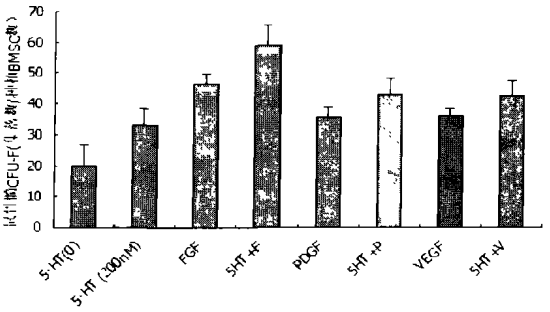


图 2 5-HT 与 FGF,PDGF,VEGF 对小鼠 CFU-F 的作用

注:5-HT(0):5-HT 浓度为 0nmol/L;5-HT(200):5-HT 浓度为 200nmol/L F:FGF,50ng/ml;P:PDGF,50ng/ml;V:VEGF,50ng/ml

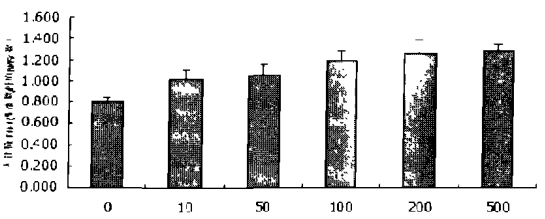


图 3 5-HT 对人骨髓 CFU-F 的作用

研究进一步比较 5-HT 与 bFGF,PDGF 和 VEGF 对小鼠骨髓 CFU-F 生长的影响。结果提示 5-HT 对小鼠骨髓 CFU-F 的作用与 PDGF 和 VEGF 相似,但较 bFGF 弱。并且 5-HT 有增强

维普资讯 http://www.cqvip.com

bFGF,PDGF 和 VEGF 对小鼠 BMSC 体外生长的作用(图 2)。

2.2 5-HT 促进人 BMSC 生长

五羟色胺(0,10,50,100,200,500nmol/L)对人 BMSC 体外培养的剂量反应曲线显示几个浓度的 5-HT 均有显著促进 CFU-F 生长($P<0.05$, $n=3$),其中最大的作用剂量为 200nmol/L($P=0.006$)(图 3)。

进一步比较 5-HT 与 bfGF,PDGF 和 VEGF 对人骨髓单个核细胞生长的影响。提示 5-HT 对人骨髓单个核细胞的作用与 bFGF,PDGF 和 VEGF 相似。并且 5-HT 可显著增强 bFGF,PDGF 和 VEGF 对人 BMSC 中单个核细胞体外生长的作用(图 4)。

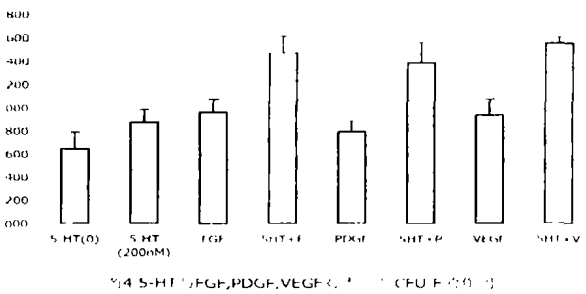


图 4 5-HT 与 FGF,PDGF,VEGF 对人骨髓 CFU-F 的作用

注:5-HT(0):5-HT 浓度为 0nM;5-HT(200):5-HT 浓度为 200nM F: FGF, 50ng/ml; P: PDGF, 50ng/ml; V: VEGF, 50ng/ml

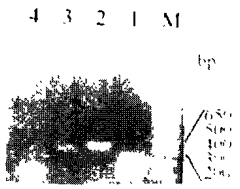


图 5 人 BMSC 的 5-HT 受体表达

注:M:marker(1kb plus DNA ladder);1:5-HT2AR;2:5-HT2BR;3:5-HT2CR;4:PDH

2.3 人 BMSC 表达 5HT2 型受体

采用 RT-PCR 方法,检测到人 BMSC 表面有 5-HT 2A、2B 和 2C 受体 mRNA 表达,(图 5)。提示 5-HT 可能通过 BMSC 表面 5-HT2 型受体途径,促进 BMSC 的生长。

3 讨 论

研究发现骨髓间充质干细胞不仅可转化为造血干细胞,而且还可诱导分化为肌肉细胞、脑细胞、肝脏细胞、心肌细胞和血管内皮细胞等;BMSC 与造血干细胞不同,前者在组织受损伤时可分化为多种细胞类型[4]。Fucuda 等首次报道 BMSC 经五氮杂胞苷诱导可转化为心肌细胞[6]。证明 BMSC 在一定条件下具有转化为心肌细胞的潜能。

5-HT 是一分子量为 176.2 道尔顿的单胺。人们早已知道作为一种血管活性物质和神经递质的 5-HT 在体内起着重要的作用。Nemecek 等[1]于 1986 年首次证明 5-HT 对血管平滑肌细胞增殖有促进作用。5-HT 的丝裂原作用以后相继在成纤维细胞,神经细胞、系膜细胞和巨核细胞得到进一步证实[5,7]。5-HT 在胚胎神经和心血管系统的发育过程起着重要的作用。研究提示 5-HT 通过 5-HT2B 受体介导,调节神经脊细胞和心肌前体细胞的分化,从而调控脑和心脏的发育[8]。

研究表明 5-HT 至少存在 14 种受体亚型,其中 5-HT1A、2A、1B、2B 和 2C 亚型的促进细胞生长发育作用研究较多。与心、脑发育关系密切的是 5-HT2B 受体。该受体亚型属于 G 蛋白偶联受体家族,当 5-HT 与该受体结合后,将激活 G 蛋白,活化磷脂酶 C,引起三磷酸甘油的快速释放,从而导致细胞内钙离子水平升高,信号传导引起 5-HT2B 受体下游的 Ras 和丝裂原活化蛋白酶激酶(MAPK)活化,最终诱导细胞进入增殖循环,促进细胞生长发育[9]。那么,5-HT 对 BMSC 是否亦具有生长促进作用呢?

本研究证明 5-HT 有促进体外培养 BMSC 生长的作用。该作用可能与 BMSC 表面 5-HT2 型受体有关。提示 5-HT 通过细胞表面 5-HT 受体,参与调控机体细胞的生长发育。

最近,Jacks 和 Weinberg 报道 5-HT 与 TPO 和 IL-11 一样,除促进骨髓巨核细胞的生长和成熟外,还可抑制 NO 诱导的细胞凋亡[10]。

心肌梗死等终末期心力衰竭导致心肌细胞坏死和功能丧失,而心脏非梗死区的心肌细胞不能再生重建坏死组织,陈旧梗死区心功能随时间进行性恶化。将胚胎心肌细胞移植入梗死区域重建心肌,是目前提出的一种新的治疗方案。然而由于伦理学等原因对胎儿组织的捐献和移植受到阻碍,而且胎儿心肌组织也不易获得。因此利用 5-HT 促进 BMSC 的生长分化作用,移植自身 BMSC 至心肌坏死

维普资讯 http://www.cqvip.com

区,并诱导其生长分化为心肌细胞替代死亡细胞,可恢复心脏功能,为根治心血管疾病的组织工程学发展奠定坚实的理论基础,具有重大的前期临床意义。

(致谢:本文得到香港中文大学科学基金资助。感谢郑秀云女士在统计学方面给予的帮助。)

参 考 文 献

[1] Nemecek GM, Coughlin, Handley DA, et al. Stimulation of aortic - smooth muscle cell mitogenesis by serotonin[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1986;83:674 - 678.

[2] Fanburg BL, Lee SL. A new role for an old molecule: serotonin as a mitogen[J]. Am J Physiol, 1997; 272: L795 - 806.

[3] Yang M, Sridiathchorn A, Athony M, et al. Serotonin uptake, storage and metabolism in megakaroblasts[J]. Int J Hematol, 1996;63:137 - 142.

[4] Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function[J]? Cell, 2001;105:829 - 841.

[5] Yang M, Li K, Lam AC, et al. Platelet - derived growth factor enhances granulopoiesis via bone marrow stromal cells [J]. Int J Hematol, 2001;73:327 - 334.

[6] Fukuda K. Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering[J]. Artif Organs, 2001;25(3):187 - 193.

[7] Dooley AE, Pappas IS, Pamavelas JG, et al. Serotonin promotes the survival of cortical glutamatergic neurons in vitro[J]. Exp Neurol, 1997;148:205 - 214.

[8] Nebigil CG, Choi DS, Dierich A, et al. 5 - Hydroxytryptamine 2B receptor is required for heart development[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2000;97:9508 - 9513.

[9] Nebigil CG, Launay JM, Hickel P, et al. 5 - Hydroxytryptamine 2B receptor regulates cell - cycle progression: Cross talk with tyrosine kinase pathways[J]. Proc Nat Acad Sci USA, 2000;97:2591 - 2596.

[10] Battinelli E, Loscalzo J. Nitro oxide induces apoptosis in megakarocytic cell lines[J]. Blood, 2000;95:3451 - 3459.

(上接第 209 页)

2002;62,5089 - 5095.

[3] 佘 强,陈运贞. 大鼠缺血心肌中 VEGF 表达及毛细血管新生的动态变化[J]. 重庆医科大学学报, 2002;27(4):406 - 409.

[4] 吴小候,罗春丽. 膀胱移行细胞癌尿脱落细胞 VEGF 表达的研究[J]. 重庆医科大学学报, 2002;27(1):45 - 47.

[5] M. C. Krishna S, English K, Yamda J, et al. Overhauser enhanced magnetic resonance imaging for tumor oximerry: coregistrarion of tumor anatomy and tissue oxygen concentration [J]. Proc Natl Acad Sci, 2002;99:2216 - 2221.

[6] H. Kimura A, Weisz Y, Karashima K, et al. Hypoxia response element of the human vasculax endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia - inducible factot - 1 activity by nitric oxide[J]. Blood, 2000;95:189 - 197.

[7] Ryuto M, Ono M, Izumi H, et al. Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha in human glioma cells. Possible roles of SP - 1[J]. J Biol Chem, 1996;271(45):28220 - 28228.

[8] Berra E, Pages G, Pouyssegur J. MAP kinases and hypoxia in the control of VEGF expression. Cancer[J]. Metastasis Rev, 2000;19(1 - 2):139 - 145.

[9] Semenza GL. Hypoxia - inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology[J]. Trends Mol Med, 2001: 7(8):345 - 350.

[10] Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: 02 - sensing protein hydroxylases, hypoxia - inducible transcription factors, and 02 - regulated gene expression[J]. FASEB J, 2002; 16 (10):1151 - 1162.