维普资讯 http://www.cqvip.co

文章编号:0253-3626(2005)01-0085-04

肝细胞生长因子促血管内皮细胞增殖及迁移的研究

唐 博[1], 罗文军[1], 严润彬[2], 陈若飞[1]

(1.重庆医科大学第二临床学院血管外科,重庆 400010;2.重庆大学生物工程学院,重庆 400044)

【摘 要】目的:探讨重组人肝细胞生长因子(rhHGF)对人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)增殖和迁移的影响及其促血管生成作用。方法:从脐静脉体外分离培养 HUVEC,采用四甲基偶氮唑蓝法(MTT)观察 rhHGF 对 HUVEC 的增殖作用,倒置显微镜观察 HUVEC 的迁移,透射电镜观察超微结构的改变及流式细胞仪检测细胞周期的改变。结果:(1)rhHGF 对培养的 HUVEC 有显著的促增殖和迁移作用,且成浓度和时间依赖性。(2)rhHGF 促使 HUVEC 细胞超微结构的改变,线粒体和粗面内质网增多,常染色质增多(3)细胞周期分布改变:S 期、G2/M 期细胞增多。结论:rhHGF 能显著促进 HUVEC 的增殖和迁移,提示其可能具有促血管生成作用。

【关键词】肝细胞生长因子;血管内皮细胞;增殖;迁移;细胞周期

【中国图书分类法分类号】R654.3;R543 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-07-01

The effects of recombinant human hepatocyte growth factor on proliferation and migration of human umbilical vein endothelial cells

TANG Bo, et al

(*Department of Vascular Surgery, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of hepatocyte growth factor on proliferation and migration of human umbilical vein endothelial cells, and to further study the angiogenesis of HGF. *Methods*: The cultured endothelial cells in vitro were isolated from human umbilical vein. The proliferation of HUVECs were measered by MTT and their migration were observed using reverse microscope. The changes of celluar ultrastructure were observed under electron microscope and flow cytometry was applied to observe the effects of rhHGF on cell cycle. *Results*: rhHGF could promote the proliferation and migration of HUVECs dose-dependently and time-dependently. There were obvious changes in celluar structure, rhHGF could increase mitochondrion, rough endoplasmic reticulum and euchromatin. *Conclusion*: rhHGF could promote the proliferation and migration of HUVECs significantly, which suggests that HGF might have the effect of angiogenesis.

【Key words】Hepatocyte growth factor; Endothelial cells; Proliferation; Migration; Cell cycle

肝细胞生长因子(HGF)是一种具有多功能的间质源性细胞因子,是由相对分子质量为 69KD 的重链(α-chain)和 34KD 的轻链(β-chain)通过二硫键构成的异二聚体,基因约 70kb,本研究通过 MTT 法观察 rhHGF 对体外培养的人脐血管内皮细胞的增殖作用,倒置显微镜观察 HUVEC 的迁移及透射电镜下超微结构的改变,并通过流式细胞仪检测了细胞周期的变化,探讨 HGF 的促血管生成作用,为进一步研究其调控机理提供依据。

作者介绍:唐 博(1979-),男,硕士生,
主要研究方向:血管疾病的诊断与治疗。

1 材料与方法

1.1 材料

新生儿脐带由重庆医科大学第二临床学院产科提供,重组人肝细胞生长因子(rhHGF)购自 PeproTech 公司,胶原酶Ⅰ、胰蛋白酶、MTT 均为 Sigma 产品,DMEM/F12 培养基及胎牛血清(FBS)为 Hyclone 产品,兔抗人Ⅷ因子、链霉卵白素/过氧化物酶(SP)、DAB 试剂盒购自北京中山公司。

1.2 原代人脐血管内皮细胞的体外培养及鉴定

取正常妊娠足月分娩的新生儿脐带,无菌条件下剪去钳痕、血肿和凝血块阻塞部分,PBS 洗净脐静脉后注入 0.1% 胶原酶使血管充盈,置于 37℃ 孵育 15min 后收集脐静脉内细胞液,离心后用含 20% FBS 的 DMEM/F12 培养液制成细胞悬液,以 $1.5\times10^4\sim3.5\times10^4/cm^2$ 的细胞浓度接种到 1%

维普资讯 http://www.cqvip.com

明胶预包被的 25ml 培养瓶中，每 2 天换液，待细胞汇长密集后用 0.25% 胰蛋白酶－0.1% EDTA 进行传代培养。SP 法检测Ⅷ因子相关抗原和透射电镜观察内皮细胞特有的 Weibel—Palade 小体对细胞进行鉴定(图 1、2)，第 2－4 代内皮细胞用于实验(图 3)。

1.3 MTT 比色法测定细胞增殖

实验分组：(1)空白组　不加细胞只加入 DMEM/F12 细胞培养基。(2)对照组　传代细胞以每孔 1×10^4 的密度种植于 96 孔板中，同时加入培养基。(3)rhHGF 处理组　每孔加入 1×10^4 个细胞同时培养基中加入 rhHGF，使终浓度达 1ng/ml、10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、100ng/ml，每组设 6 个复孔，置 37℃，5% CO_2 条件下孵育。分别于 24h、48h、72h 终止培养，每孔加入 MTT 溶液(5mg/ml)20ul/孔，继续孵育 4h，终止培养，小心吸弃上清液。每孔加入 150ul DMSO，振荡 10min。在酶联免疫检测仪上 570nm 波长比色，以空白组调零测定各孔平均吸光度值(A 值)。

1.4 HUVEC 迁移的观察

在 6 孔培养板中每孔先放入两张有上下边中点连线标记 18mm×18mm 盖玻片，使中线重叠，将 HUVEC 以 1×10^5 个/孔种植，静置培养 2 天后取出上层盖玻片，则下层盖玻片的右侧半就呈现一个矩形空白区，实验分组：(1)对照组加入 2%FBS 的 DMEM/F12 培养液，(2)实验组分别加入含 2% FBS 及终浓度为 1ng/ml、10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、100ng/ml rhHGF 的培养液，继续培养 24h 后，在倒置显微镜低倍镜下(×10 倍)观察进入空白区的细胞的数量及其形态。并在高倍镜下(×40 倍)每边选 5 个视野，计数进入空白区的细胞数，每组 6 个孔，移行能力＝(实验组移行细胞数－对照组移行细胞数)/对照组移行细胞数×100%。

1.5 细胞超微结构的观察

将对照组及 50ng/ml rhHGF 处理组按透射电镜常规方法制片观察。

1.6 流式细胞仪检测

取第 3 代对数生长期 2×10^4/ml 细胞悬液，换含 2% FBS 的培养液，使细胞同步于 G0 期，将 HUVEC 随机分为①正常对照组；②25ng/ml rhHGF 组；③100ng/ml rhHGF 组培养 24h，用 70% 乙醇 2ml 固定，再用 PBS 液洗两次，调整细胞浓度为 1.0×10^6，加入 PI 染色液 1.0ml 于 4℃ 染色 30min 后行流式细胞仪分析，测定 G0 期/G1 期、S 期、G2 期/M 期值，计算细胞增殖指数(PI)，PI＝(S＋G2/M)/(G0/G1＋S＋G2/M)%。

1.7 统计学方法

实验结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，组间比较采用 t 检验。

2 结　果

2.1 rhHGF 对 HUVEC 增殖的影响

rhHGF 能显著刺激 HUVEC 的生长，rhHGF 的最小显效浓度是 1ng/ml，在 1ng/ml～100ng/ml 浓度范围内，加入 rhHGF24h 后，低浓度组(1、10ng/ml)促增殖作用不明显，而 25、50、100ng/ml 组 HUVEC 增殖显著($P<0.05$、0.01、0.01)，同时加入 rhHGF 后 48h 和 72h，HUVEC 增殖明显加快，与对照组相比 $P<0.01$，增殖作用在 rhHGF 浓度为 100ng/ml 作用 72h 后达最大值。(见表 1，图 4)

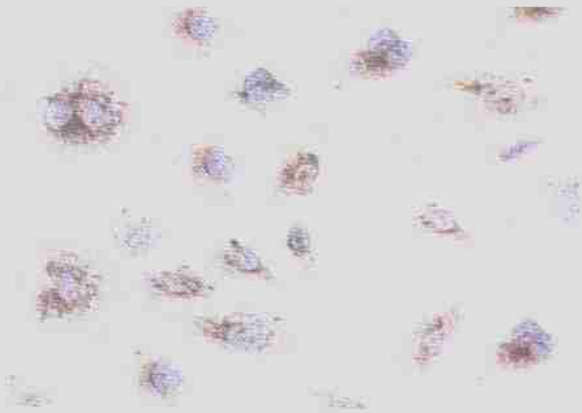


图 1　HUVECs 中Ⅷ表达呈阳性(SP×400)

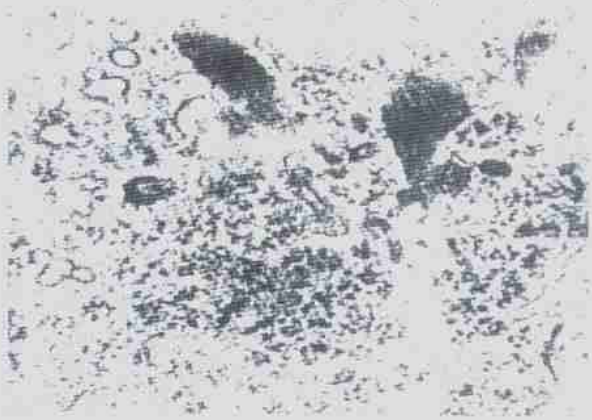


图 2　透射电镜下内皮细胞特有的 Weibel—Palade 小体(黑箭头示×15000)



图 3　原代培养 HUVEC 的相差倒置显微镜下形态(×100)

维普资讯 http://www.cqvip.com

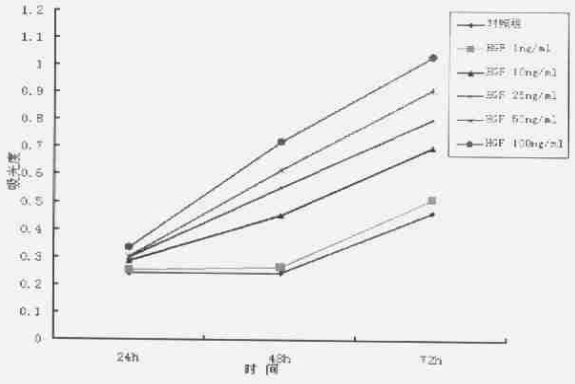


图 4　不同浓度的 rHGF 对 HUVEC 的促增殖作用

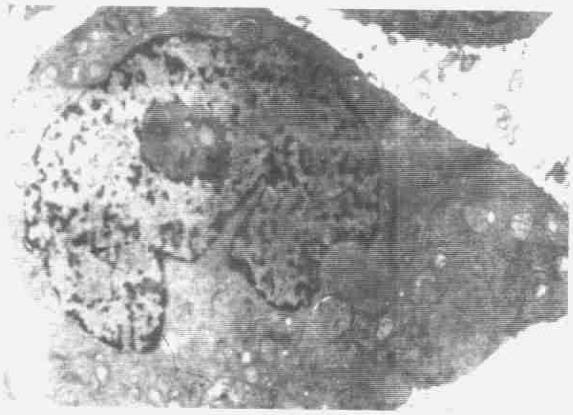


图 5　细胞器增多，粗面同人质网增多且囊腔扩张，核仁肥大，常染色质增多（TEM×80000）

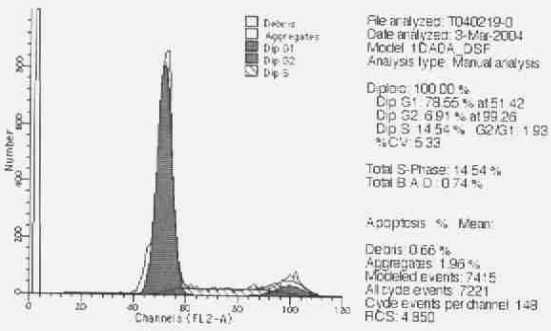


图 6　对照组的流式细胞仪结果

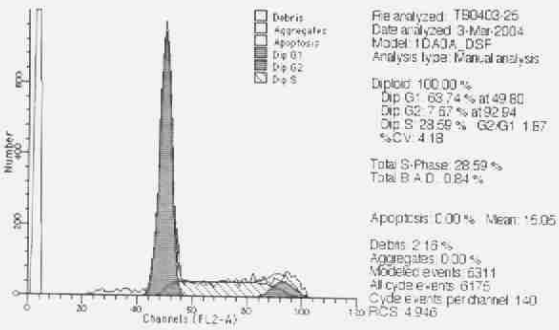


图 7　25ng/ml HGF 作用后的流式细胞仪结果

2.2　rhHGF 对 HUVEC 迁移的影响

倒置显微镜下观察 rhHGF 组 HUVEC 细胞较对照组移行能力强，细胞膜突起增多，1ng/ml、10ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、100ng/ml 浓度的 rhHGF 所对应细胞移行能力分别为 7%、32%、75%、210%、430%。

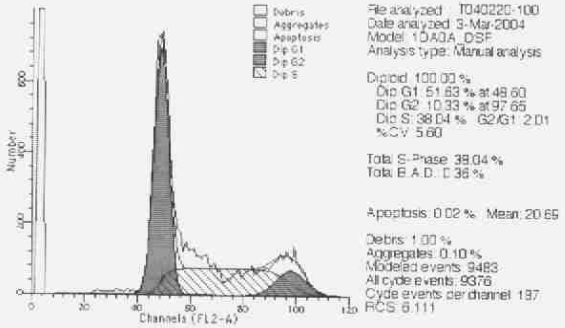


图 8　100ng/ml HGF 作用后的流式细胞仪结果

表 1　不同浓度 HGF 对培养的 HUVEC 的促增殖作用（$n=6$）

组别	吸光度（A）		
	24h	48h	72h
对照组	0.241±0.018	0.246±0.015	0.463±0.033
rHGF 组（ng/ml）			
1	0.245±0.007	0.265±0.030	0.510±0.013**
10	0.287±0.022*	0.453±0.022**	0.698±0.015**
25	0.299±0.045**	0.554±0.020**	0.801±0.007**
50	0.303±0.039**	0.616±0.016**	0.911±0.009**
100	0.337±0.035**	0.718±0.011**	1.030±0.035**

注：与对照组比较：* $P<0.05$，** $P<0.01$

2.3　细胞超微结构的改变

实验组细胞胞浆丰富，细胞器增多，线粒体丰富，粗面内质网增多且囊腔扩张，细胞核高度畸形、形态不规则、核仁肥大数量增多、常染色质增多（图 5）。

2.4　细胞周期分布的影响

流式细胞仪结果显示，HGF 对 HUVEC 的促增殖作用主要是促进 HUVEC 由细胞间期进入有丝分裂期（M 期），从而促进细胞的增殖。对照组处于 G2－M 期的细胞数占总细胞数的 6.86%，而 HGF 组中处于 G2－M 期的细胞数占总细胞数的 7.67%（25ng/ml）、10.33%（100ng/ml）。M 期为细胞的有丝分裂期，此期每个细胞将分裂成 2 个子细胞，细胞分裂相的多少可作为细胞生活状态和增殖旺盛情况判定的重要参考指标。细胞的增殖情况可用细胞增殖指数表示，本实验中细胞增殖指数为对照组 PI＝21.45%，HGF 组 $PI_{25}=36.26\%$，$PI_{100}=48.37\%$，（图 6～8）。

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

由血管内皮细胞损伤所致相关疾病日渐增多，每年每百万人中约有 500～1000 人发生严重的肢体动脉闭塞性疾病[1]。目前尚无任何一种药物治疗能对严重缺血肢体的自然病程产生积极作用，因此迫切需要寻求一种新的有效的治疗方法。1993 年 Hockel[2]等开始提出应用促血管生长的细胞因子诱导生成侧枝循环的新疗法，称为“治疗性血管生成”。而目前已有大量研究证实，多种生长因子能调节内皮细胞的生物学活性，刺激内皮细胞的增殖，包括血管内皮细胞生长因子（VEGF）、碱性成纤维细胞因子(bFGF)等，而 HGF 最初认为靶细胞只有肝细胞，但随后的研究表明 HGF 能作用于多种细胞。

本实验研究观察到当 HGF 浓度达 100ng/ml 及培养时间至 72h 血管内皮细胞的增殖和迁移能力与对照组相比差异有显著性（$P<0.001$），说明这种促增殖和迁移作用具有显著的剂量和时间依赖性，细胞超微结构也发生了相应变化，而流式细胞仪结果显示，HGF 组 G2－M% 较对照组显著增高，细胞增殖指数(PI)也增高，而细胞增殖指数(PI)代表细胞群体的增殖状态和 DNA 合成速度。本实验中 HGF 对 HUVEC 的促增殖作用主要是促使细胞进入 M 期，M 期为细胞的有丝分裂期，这充分说明 HGF 能有效地促进 HUVEC 的有丝分裂过程，首次从定量和定性两方面证明了 HGF 通过影响细胞周期分布促进血管内皮细胞的增殖和迁移，国内未见相关文献报道。

自从 Isner[3] 治疗小组 1994 年 12 月采用 phVEGFl65 进行了第 1 例临床血管疾病基因治疗以来，绝大多数临床研究集中在利用 VEGF 或 FGF 治疗冠状动脉或外周血管缺血性疾病，并已取得了显著效果[4]。而 HGF 与 VEGF 相比具有以下几个优点：1. 对血管内皮细胞具有高度特异性，可促使平滑肌细胞迁移，但无促平滑肌细胞增殖的不利作用；2. HGF 受体 c－Met 在缺血组织中表达上调及信号传导通路中 ERK 独特的再磷酸化活性均使 HGF 的血管新生作用得以增强；3. VEGF 可使血管通透性增加导致水肿，诱发疼痛，而 HCF 则可避免此副作用；4. HGF 具有分解胶原能力，并可增加分解基质的 MMP—1 和具激活纤溶酶功能的尿激酶(uPA)，uPA 能激活非活化型 HGF，而前体 HGF 一旦被激活，又可进一步激活 uPA，这种循环作用能更好地改善组织血供；5. 内源性血管壁 HGF 低下使 HGF 治疗的安全阈值较高。因此 HGF 有望成为继血管内皮细胞生长因子和碱性成纤维细胞因子后第 3 种有治疗性血管新生作用的细胞因子[5]。但血管生成是一种多因素影响的综合结果，涉及一系列相关细胞的增殖、迁移和分化等生物学过程，而 HGF 对以上细胞活动影响的具体机制及与其他细胞因子的相互作用问题仍有待进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] European Working Group On Critical Leg Ischemia. Second European consensus document on chronic critical Leg Ischemia[J]. Circulation, 1991; 84(suppl IV): I－26.

[2] Hockel M, Schlenger K, Soctrow S. Therapeutical angiogenesis[J]. Arch Surg, 1993; 128(4): 423－429.

[3] Zuckerbraun BS, Tzeng E. Vascular gene therapy[J]. Arch Surg, 2002; 137(7): 854－861.

[4] Bashir R, Vale PR. Isner JM. et al. Angiogenic gene therapy: pre－clinical studies and phase I clinical data[J]. Kidney International, 2002; 61(1): 110－114.

[5] Morishita R, Aoki M, Hashiya N,. Hepatocyte growth factor(HGF)angiogenic gene therapy: promise for cardiovascular disease[J]. Gene Therapy and Regulation, 2002; 1(4): 343－359.