DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.24.017
第25卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 24
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)24-2205-03

论著

内皮细胞生长因子诱导大鼠血管内皮细胞增殖过程中FKBP12的表达

王耀辉,杨成明,王旭开,刘光耀,石伟彬,张 晔 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所心内科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨内皮细胞生长因子(Endothelial cell growth factor, ECGF)诱导的血管内皮细胞(Vascular endothelial cell, VEC)增殖过程中FK506结合蛋白12(FK506 binding protein 12, FKBP12)表达的变化,为VEC的鉴定提供新的方法。方法 培养大鼠VEC并传代。倒置显微镜下观察其在ECGF作用下的增殖情况,检测Ⅷ因子相关抗原、FKBP12和不同时期FKBP12 mRNA水平的表达。结果 VEC表达FKBP12;VEC传代后第4天FKBP12 mRNA表达水平达到最高,6~8 d下降。结论 FKBP12既可作为VEC的标志物,又可反映VEC的增殖情况。

关键词:血管内皮细胞;增殖;FKBP12;ECGF
中图法分类号:R322.12;R329.28;R392.13 文献标识码:A

ECGF induces FKBP12 expression in vascular endothelial cell proliferation

WANG Yao-hui, YANG Cheng-ming, WANG Xu-kai, LIU Guang-yao, SHI Wei-bin, ZHANG Ye (Department of Cardiology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To study the changes of expression of FK506 binding protein 12 (FKBP12) in vascular endothelial cell (VEC) proliferation induced by endothelial cell growth factor (ECGF) and to provide a new way for the identification of VEC. **Methods** Rat vascular endothelial cells were cultured and passaged. After the induction of ECGF, the proliferation of VEC was observed under the invert microscope; factor Ⅷ-related antigen and FKBP12 were detected by immunocytochemistry; expression levels of FKBP12 mRNA in different culture periods were determined by semi-quantitative RT-PCR. **Results** The expressions of FKBP12 were observed in cultured endothelial cells. The expression level of FKBP12 mRNA reached a peak at 4 d after passage, and then decreased at 6~8 d. **Conclusion** The expression of FKBP12 may be a new maker in cultured endothelial cells, and can reflect the proliferation of cultured endothelial cells as well.

Key words: vascular endothelial cells; proliferation; FKBP12; ECGF

血管内皮细胞(Vascular endothelial cell, VEC)是覆盖全身所有血管的连续单层细胞,是血管的重要屏障,具有多种生理功能。随着免疫抑制剂FK506等的应用,人们对FK506的细胞内受体——FK506结合蛋白12(FK506 binding protein 12, FKBP12)的非免疫抑制功能有了越来越多的认识,这为了解其在VEC中的作用奠定了基础。本实验通过VEC培养与鉴定,并了解其在内皮细胞生长因子(Endothelial cell growth factor, ECGF)作用下的增殖过程与FKBP12表达的关系,为VEC的鉴定提供新的标志物,亦为FKBP12在心血管中的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

胰蛋白酶,DMEM培养基,胎牛血清(Hyclone公司),ECGF(Boehringer Mannheim),小鼠抗大鼠FKBP12抗体(BD Biosciences),Ⅷ因子相关抗原抗体,免疫组化试剂盒,DAB显色试剂盒(博士德公司),Tripure分离试剂(Roche公司),RT-PCR试剂盒(Takara公司),引物由上海生工生物工程公司合成。其它试剂均为国产分析纯。

1.2 VEC的原代培养

大鼠(大坪医院野战外科研究所动物中心提供)乙醚吸入麻醉后断颈,无菌条件下取主动脉(长度约4~6 cm),放入4 ℃无菌生理盐水中,洗去动脉内外血迹,将血管内膜外翻,放入0.25%胰蛋白酶溶液,并在恒温水浴箱中(37 ℃)振荡消化12 min,将血管放入含20%胎牛血清的DMEM培养液中中止消化并吹洗。收集吹洗液,常温下以1 000 r/min离心8 min,获取沉淀物。加入1 ml促内皮细胞增殖培养液[pH 7.2,内含DMEM培养液,20%胎牛血清,ECGF 15 μg/ml,青霉素200 U/ml,链霉素(100 U/ml),L-谷氨酰胺(4 mmol/L)],制成细胞悬液。取出0.1 ml放入血小板计数池中,倒置显微镜下计数。最后以(1~3)×10^4个细胞/cm^2的密度接种到25 ml培养瓶中(该瓶用8%明胶在培养箱内预处理10 min以上)。置37 ℃,5% CO_2细胞培养箱内静置培养。

1.3 VEC的传代培养

待24 h细胞贴壁后换液,以后2 d换液1次,加新鲜培养液

作者简介:王耀辉(1970—),男,河南省平顶山市人,硕士研究生,主治医师,主要从事心血管疾病方面的研究。电话:(023)68757266
通信作者:杨成明,电话:(023)68757266;E-mail:yangchmi@cta.cq.cn
收稿日期:2003-07-16;修回日期:2003-09-25

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 ml。约接种后 12~15 d，细胞呈单层密集生长，约覆盖 2/3 左右培养面时，即可传代。一般一瓶细胞传两瓶，以 0.25% 胰蛋白酶消化。传代后 2~3 d 更换培养液一次。

1.4 VEC 鉴定

1.4.1 倒置显微镜下观察细胞形态和生长特性。

1.4.2 RVEC 中Ⅷ因子相关抗原和 FKBP12 的检测 依照蔡文琴等[1]方法，进行 S-P 免疫组化染色。

1.5 VEC 增殖情况测定

选择第 3 代生长指数期的细胞，接种密度为 1×10^4 个细胞/ml 平均接种于 96 孔板的 48 孔内，分含 ECGF 培养液的实验组(ECGF group)和不含 ECGF 的对照组(Control group)。1~8 d，每 24 h 各取 3 孔细胞。胰蛋白酶消化后用 0.04% 台盼蓝染液染色 2 min，光学显微镜下计算活细胞数。每孔细胞分别计数 3 次，以平均值绘制 VEC 增殖过程中的生长曲线。

1.6 VEC 在增殖过程中 FKBP12 mRNA 的半定量分析

选择指数期生长细胞接种于 4 个 6 孔板内，用内皮细胞增殖培养液培养，每板接种 3 孔，每 3 孔为一组，第 2、4、6、8 天各取一组。总 RNA 提取：采用 Tripure 试剂一步法提取培养内皮细胞总 RNA，1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定，紫外分光光度计观察 RNA 的完整性并定量。构建 FKBP12 引物依照 Freemen 方法进行[2]，Forward primer：5′-GAG AAA AGC CAG CAT AAA GC-3′，Reverse primer：5′-TCT AGA ACT TCG GTG GAA AG-3′，产物 312 bp；以β-actin 作为内对照，其引物为 Forward primer：5′-GAG CTA CGA GCT GCC TGA CG-3′，Reverse Primer：5′-GCA TTT GCG GTG GAC GAT-3′，产物 564 bp。扩增条件为 95 ℃ 2 min，1 循环；94 ℃ 1 min，50 ℃ 1 min，72 ℃ 1.5 min，进行 30 个循环；再 72 ℃延伸 10 min。取 6μl PCR 扩增产物，琼脂糖凝胶电泳后，与内对照β-actin 比较，进行半定量分析。以目的片段与β-actin 的吸光度比值作为以目的片段 mRNA 的相对含量。

1.7 统计学方法

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，用 SPSS10.0 软件进行 F 检验和 q 检验。

2 结果

2.1 VEC 的形态和生长特性

用胰蛋白酶消化获得的 VEC 贴壁率约 70%~80%。原代培养的细胞贴壁时间在 12~15 h，而传代培养的细胞贴壁时间缩短到 3~4 h。细胞初为原形，单个或成小团块存在，贴壁伸展的细胞为单层扁平多角形细胞集落，培养 2~3 d 后，细胞迅速生长，集落增大 3~4 d 细胞生长最快，集落之间相互融合连接成片。倒置显微镜下见细胞形态呈鹅卵石镶嵌状排列，状如梭形或多角形，大小均匀。胞核清晰，呈卵圆形，见图 1。

2.2 VEC 中Ⅷ因子相关抗原和 FKBP12 的检测

S-P 免疫组化检测呈阳性染色，见图 2，3。

2.3 VEC 生长曲线

在实验组中，VEC 生长曲线为典型的“S”形，在细胞培养的第 1 天数量有所减少，第 2 天开始生长，但速度较慢，第 3~4 天生长最快，进入对数生长期，第 5 天生长速度又开始放慢，6~8 d，VEC 基本停止生长，细胞倍增时间为第 3 天。而在对照组中，细胞生长速度极其缓慢，无明显的细胞倍增时间，见图 4。

2.4 VEC 中 FKBP12 mRNA 的检测

ECGF 诱导的 VEC 增殖过程中 FKBP12 基因在接种后第 2、4、6、8 天的表达量，分别为：(0.50±0.06)、(1.33±0.08)$^{\triangle\triangledown}$、(1.10±0.05)$^{\triangle\triangledown}$、(0.79±0.05)$^{\triangle}$，(△：与第 2 天比较 $P<0.01$；▽：与第 8 天比较 $P<0.01$)，见图 5。



图 1 倒置显微镜下的 **VEC**(×200)

Fig 1 VEC under an inverted phase microscope (×200)



图 2 **VEC** 的Ⅷ因子相关抗原染色，可见细胞呈棕黄色 (S-P×400)

Fig 2 Brownish red in cultured VEC, indicating the expression of factor Ⅷ related antigen (S-P×400)



图 3 **VEC** 的 **FKBP12** 染色，可见细胞呈棕黄色 (S-P×400)

Fig 3 Brownish red in cultured VEC, indicating the expression of FKBP12 (S-P×400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

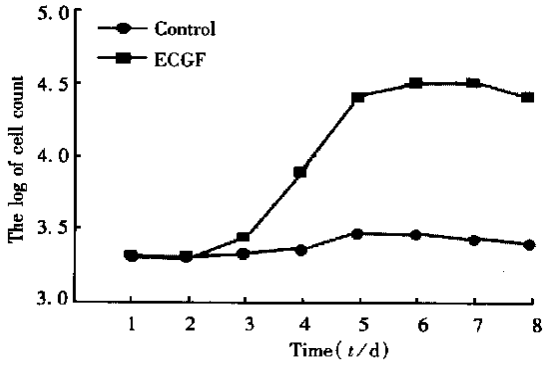
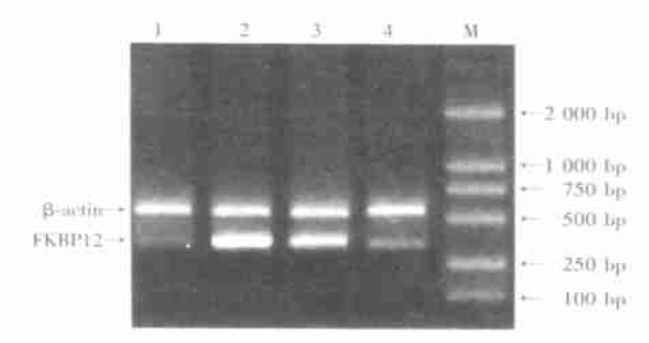


图 4　VEC 生长曲线

Fig 4　Growth curve of VEC



M: PCR Marker; 1—4: Induction for 2, 4, 6 and 8 day respectively

图 5　ECGF 诱导的 VEC 增殖过程中 FKBP12 基因的表达

Fig 5　Expressions of FKBP12 mRNA in VEC proliferation induced by ECGF

3　讨论

ECGF 是一种有效的促进血管内皮细胞增殖的生长因子, 本实验采用消化法, 在 ECGF 诱导下成功培养出 VEC。关于 VEC 的鉴定方法, 通常采用 Ⅷ因子相关抗原抗体染色法。最近, Higgins 等[3] 提出 FKBP12 在良恶性血管内皮中表达丰富; 应用 CD31, CD34 和 FKBP12 对 59 种血管瘤进行免疫组化和 Western blot 分析鉴定显示: 与 CD31 和 CD34 相比, FKBP12 的相对敏感性为 94.9%, 相对特异性为 96.5%, 因此, 认为 FKBP12 可作为血管或血管内皮细胞鉴定的另一标志物。本实验利用免疫组化检测证实, FKBP12 和 Ⅷ因子相关抗原在培养的内皮细胞呈阳性染色, 进一步证实了 FKBP12 是血管内皮细胞新的标志物。至于 FKBP12 与 Ⅷ因子相关抗原之间的相关性及其是否与物种有关, 有待于进一步研究。

近年研究表明, FKBP12 与理阿诺碱受体(Ryanodine receptor, RyR)和三磷酸肌醇受体[Ins(1, 4, 5)P(3) receptor; IP3R] 存在生理学的联系, 调节 Ca^{2+} 释放; Kohler 等[4] 认为, 介导 Ca^{2+} 释放的 IP3 R 和 RyR3 可能是内皮 Ca^{2+} 原位信号传导和完整血管内皮功能的重要的组成部分。Zohlnhofer 等[5] 从支架置入术后患者的再狭窄部位取出的新生内膜中发现 FKBP12 在蛋白水平上调。在动物模型中, 经 FKBP12 介导发挥免疫抑制作用的雷帕霉素可减少新生内膜的形成。Xu 等[6] 发现在 FKBP12 缺陷的细胞, 经 FKBP12 介导发挥免疫抑制作用的 FK506 不发挥生长抑制作用; 而在 FKBP12.6(FKBP 的另一种亚型)缺陷的细胞, FK506 却发挥生长抑制作用。另外, Aghdasi 等[7] 发现有 FKBP12 缺陷的鼠细胞停滞在细胞周期 G_1 中, 这些细胞能被转染的 FKBP12 激活; FKBP12 可抑制由转化生长因子-β 受体(Transforming growth factor-beta receptor, TGF-βR)信号的过度活动引起的 P21 上调和细胞周期停滞; FKBP12 在正常情况下通过下调 TGF-βR 信号传导而影响细胞周期的调节。因而, FKBP12 可能与内皮细胞的功能和增殖情况密切相关。目前内皮细胞或血管新生内膜在增殖过程中 FKBP12 基因变化及其作用的文献还缺乏, 本实验初步提示 ECGF 诱导的内皮细胞增殖过程中 FKBP12 基因表达变化显著, 接种后第 2 天其表达最低, 第 4 天显著增高, 第 6 和 8 天均有所降低。表明 FKBP12 基因表达量与内皮细胞增殖情况呈正相关。因此, FKBP12 既可作为 VEC 的标志物, 又可能反映 VEC 的增殖情况, FKBP12 可能成为血管内皮细胞的理想标志物。

参考文献:

[1] 蔡文琴, 王伯沄. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 8—20.

[2] Freeman E E, Grosskreutz C L. The effects of FK506 on retinal ganglion cells after optic nerve crush[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(5): 1111—1115.

[3] Higgins J P, Montgomery K, Wang L, *et al*. Expression of FKBP12 in benign and malignant vascular endothelium: an immunohistochemical study on conventional sections and tissue microarrays[J]. Am J Surg Pathol, 2003, 27(1): 58—64.

[4] Kohler R, Brakemeier S, Kuhn M, *et al*. Expression of ryanodine receptor type 3 and TRP channels in endothelial cells: comparison of *in situ* and cultured human endothelial cells[J]. Cardiovasc Res, 2001, 51(1): 160—168.

[5] Zohlnhofer D, Klein C A, Richter T, *et al*. Gene expression profiling of human stent-induced neointima by cDNA array analysis of microscopic specimens retrieved by helix cutter atherectomy: Detection of FK506-binding protein 12 upregulation[J]. Circulation, 2001, 103(10): 1396—1402.

[6] Xu X H, Su B, Barndt R J, *et al*. FKBP12 is the only FK506 binding protein mediating T-cell inhibition by the immunosuppressant FK506[J]. Transplantation, 2002, 73(11): 1835—1838.

[7] Aghdasi B, Ye K, Resnick A, *et al*. FKBP12, the 12-kDa FK506-binding protein, is a physiologic regulator of the cell cycle[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(5): 2425—2430.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net