

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.08.003

基底刚度对血管内皮细胞生长与增殖的影响

盛尚春, 邱菊辉, 唐朝君, 王贵学
(重庆大学生物工程学院, 重庆 400044)

【摘要】目的:以细胞生长所粘附的胞外基底的力学特性为对象,通过将人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)接种于不同刚度的基底上,借以阐明基底刚度对其生长和生物学活性的影响。方法:以双丙烯酰胺和丙烯酰胺复合物为原料,构建不同基底刚度基底膜,经灭菌且胶原交联后接种 HUVECs,分别进行 MTT 试验、鬼笔环肽细胞染色以及流式细胞技术检测细胞的生长周期。结果:随着基底刚度的增强, HUVECs 增殖的速度明显受到抑制($P<0.01$);且细胞形态和生长周期也出现相应的变化。结论:基底刚度的改变在 HUVECs 的生长和增殖方面均有较大的影响,这可为进一步解释动脉粥样硬化中血管内皮细胞形态和功能紊乱提供了相应的生物力学依据。

【关键词】基底刚度;人脐静脉内皮细胞;生长;增殖

【中国图书分类法分类号】R363.14

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-12-09

Effect of stiffness of substrate on vascular endothelial cell growth and proliferation

SHENG Shangchun, QIU Juhui, TANG Chaojun, WANG Guixue
(Bioengineering College, Chongqing University)

【Abstract】Objective: To clarify the effect of substrate stiffness on the growth and biological activity of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) through studying the mechanical properties of substrate for cell growth and inoculating HUVECs to substrates with different stiffness. Methods: Substrates with different stiffness were built by using bisacrylamide and acrylamide compounds. The substrates were sterilized and were cross-linked by collagen to inoculate HUVECs. MTT assay, phalloidin cell staining and flow cytometry analysis were performed to detect the cell cycle. Results: With the enhancement of base stiffness, the proliferation of HUVECs was inhibited significantly ($P<0.01$) and the cell morphology and growth cycle were also changed accordingly. Conclusions: The changes in substrate stiffness have great impact on the growth and proliferation of HUVECs, which gives further biomechanical evidence to explain the atherosclerotic vascular endothelial cell morphology and dysfunction.

【Key words】stiffness of substrate; human umbilical vein endothelial cells (HUVECs); growth; proliferation

动脉粥样硬化引起的心脑血管疾病已经是导致人类死亡的重要原因之一,目前研究对其发生的机制做了如下归纳:包括脂质浸润学说、血栓形成学说、平滑肌细胞克隆学说等^[1]。近年的研究中,多数学者支持“内皮损伤反应学说”。认为本病各种主要危险因素最终都损伤动脉内膜,而粥样硬化病变的形成是动脉对内膜损伤作出的炎症——纤维增生性反应的结果,并与心脑血管疾病的发生率具有

关联性^[2]。血管在高血压或动脉粥样硬化情况下,刚度明显增加^[3]。但血管刚度的增加如何调控内皮细胞的生长和生理功能,目前还没有详尽的报道。因此,本研究从生物力学的角度出发,通过构建不同硬度的硅胶基底膜,研究其对入脐静脉内皮细胞 (Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 的生物力学作用,以期能更进一步的阐释基底刚度对内皮细胞在动脉粥样硬化形成中的作用。

作者介绍:盛尚春(1982-),男,检验师,硕士,
研究方向:心血管生物力学。

通信作者:王贵学,男,教授,Email: wanggx@cqu.edu.cn。

基金项目:教育部中央高校基本科研业务费资助项目(编号:CD-JZR10230009)。

1 材料与方法

1.1 实验材料

HUVECs 细胞株(重庆大学应用生物技术实验中心),

RPMI1640 培养基 (Invitrogen 公司), 酶标仪, 流式细胞仪 (BD 公司), 胰蛋白酶, 胎牛血清 (杭州四季青有限公司), MTT 试剂 (Sigma 公司), 鬼笔环肽试剂, PBS 液 (自配)。

1.2 实验方法

1.2.1 不同刚度基底膜构建 双丙烯酰胺:1 g 粉剂:100 ml 三蒸水; 丙烯酰胺:30 g 粉剂:100 ml 三蒸水。配胶刚度及所用双丙烯酰胺和丙烯酰胺溶液的量详见表 1。配制过程:按表 1 所示比例配在烧杯里,配好后保鲜膜封口,扎孔抽氧(>10 min,直到胶底有泡)加胶连剂——过硫酸铵 30 μ l,迅速搅匀,再加四甲基乙二胺,迅速搅匀后,迅速加入到胶板(0.75 mm)里,取下以双抗生素(青霉素 & 链霉素 1:1,稀释 1 000 倍)泡 24 h 即可用原子力显微镜测硬度。前处理:溶胀后用 6 孔板或 12 孔板大小切膜 75%酒精泡至脱水(形如滤纸)用 Hepes (固体配成液体 11.925 g—定容至 1 L)泡开,洗 2 次表衬——加胶连剂 sulfo-SANPAH,紫外照射 8 min,重复 2 次;用 Hepes 洗 3 次——整个过程一定要避光,加纤连结合蛋白(Hepes 稀释成 2.5 μ g/ml)4 $^{\circ}$ C 过夜(或 37 $^{\circ}$ C 1~2 h)PBS 洗 3 次,5 min 后用双抗泡 30 min 左右,紫外照 30 min 到 2 h,然后加入培养液平衡 30 min 到 1 h,备用。

1.2.2 MTT 试验 96 孔培养板基底膜构建:将上述不同刚度基底膜按照 96 孔板孔径大小进行切割后置于其中后, HUVECs 传代培养 24 h 后胰酶消化制成细胞悬液接种于膜上,接种细胞密度为 50 个/ μ l,于 37.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱培养 24 h 后,进行 MTT 试验。

1.2.3 骨架染色 将 1.2.1 所构建的不同刚度基底膜按照 12 孔板孔径大小进行切割后置于其中后,接种 1×10^5 个/ml 浓度的 HUVECs 于膜上,于 37.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱培养 24 h 后进行鬼笔环肽染色,共聚焦显微镜采集图像。

1.2.4 流式细胞仪检测不同刚度基底膜上培养 HUVEC 细胞周期 将 1.2.1 中不同刚度基底膜按照 96 孔板孔径大小进行切割后置于其中后,接种 HUVECs 于膜上,于 37.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱培养 24 h 后,以 2.5 g/L 的胰酶消化后制备浓度为 1×10^5 个/ml 的细胞悬液,接入与步骤 2.2 相同的 12 孔培养皿中,于 37.5 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱培养 24 h 后以胰酶消化,1 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 5 min,弃去上清液,以 PBS 洗涤 1 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 1 min,共 2 次,加入 PBS 1 ml,无水乙醇 2 ml,震荡混匀,密封后送第三军医大学西南医院进行细胞周期检测。

1.3 统计学方法

用 SPSS 18.0 对不同基质刚度对细胞分裂周期的影响的 MTT 数据和流式检测数据进行计数资料两样本均数比较的 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

通过 MTT 实验研究发现(图 1),随着刚度的增加,细胞的增殖受到抑制,生长在 30 kPa 的基底膜上的 HUVECs 从接种的第 3 天开始细胞增殖抑制作用即开始体现。而通过鬼笔环肽细胞染色则可以看出,随着基底刚度的增加,生长于

其表面的 HUVECs 数量和形态也出现相应的变化。其主要变化体现在,在相同放大倍数的显微镜显示下,细胞数目伴随着基底刚度的增加而减少;同时,细胞形态也由梭型为主变为椭圆形为主(图 2)。通过流式细胞术对生长于不同基底刚度的 HUVECs 进行细胞分裂周期检测发现,随着基底刚度的增加,其细胞分裂周期明显受到抑制,表现为 G₁ 期细胞所占百分比下降($P < 0.05$),而其他时期细胞比例无明显变化($P > 0.05$)(图 3)。

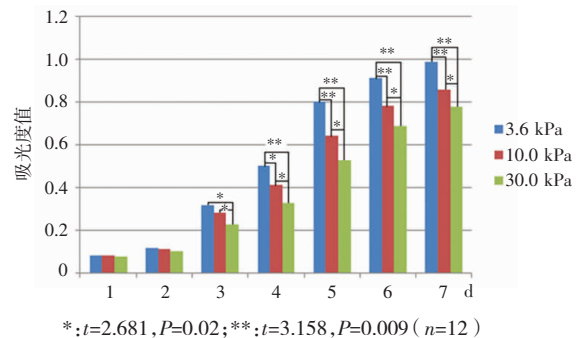
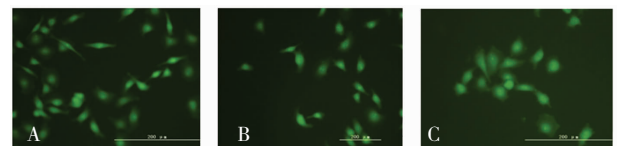


图 1 不同基质刚度对细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of different substrate stiffness on the cell proliferation



A. 3.6 kPa 基底膜上 HUVECs 形态; B. 10 kPa 基底膜上 HUVECs 形态; C. 30 kPa 基底膜上 HUVECs 形态

图 2 不同基质刚度对细胞形态的影响

Fig.2 Effect of different substrate stiffness on the cell morphology

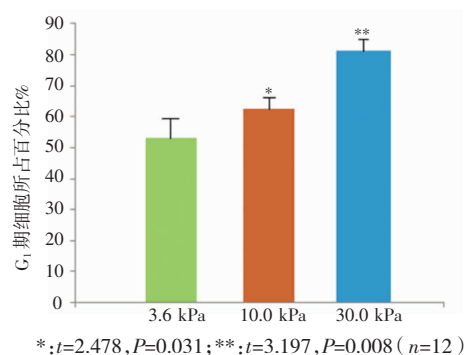


图 3 不同基质刚度对细胞分裂周期的影响

Fig.3 Effect of different substrate stiffness on the cell growth cycle

表 1 不同刚度的基底膜

基底膜刚度 (Pa)	丙烯酰胺溶 液 (ml)	双丙烯酰胺溶液 (ml)	三蒸水 (ml)
3 600 (4 000)	1.25	1.00	2.75
10 000 (6 000)	1.50	1.00	2.50
30 000 (12 000)	2.00	1.50	1.50

3 讨 论

动脉顺应性的下降即动脉刚度增加,常伴随着年龄的增加或某些疾病的发生而出现,如肥胖、高血压、糖尿病、慢性肾病以及动脉粥样硬化疾病等。尤为突出的是其作为动脉粥样硬化病发生和发展的一个重要的组成部分^[4,5],常与心血管疾病的致死率成正比关系^[6]。但到目前为止,其相关机制也未明了。有学者认为其主要原因是胞外基质刚度的增加^[7,8],从而导致细胞的生长环境出现变化,引起动脉血管顺应性的下降,从而导致动脉血管弹性的减弱(即血管刚度的增加),是心血管疾病是一个独立危险因素^[9,10],并与心血管疾病的发病率相关联^[11]。动脉血管刚度的增加单独或与其他因素协同作用于血管内皮细胞,导致血管内皮细胞生长和生理功能的紊乱,从而导致动脉粥样硬化形成或加速心肌肥大、缺血以及梗死^[7,12]。

本文通过将 HUVECs 接种于构建 3 个不同的基底刚度的硅胶膜上,观测细胞在其上面的生长增殖速率的变化,检测细胞在不同刚度的基底膜上细胞形态及骨架的改变以及通过流式细胞术检测其生长周期的改变与细胞接触基底刚度之间的变化。通过本次研究发现,基底刚度对细胞影响的首要因素体现在对细胞生长周期的影响上。基底越硬,其刚度越大,越抑制细胞的生长和分裂。这也许是动脉粥样硬化中粥样斑块表面内皮细胞生长周期延长,分裂减弱,导致内皮细胞生理功能失衡的原因之一。而基底刚度的改变对 HUVECs 分裂周期的影响则对 MTT 实验的结果予以了相应的支持。而整个实验中,不同基底刚度对细胞形态的改变则有可能是细胞为了更好的与基底膜接触,以实现其生长而出现的代偿性的形态改变以适应其接触面,这种改变则可能是产生导致动脉粥样硬化发展的另外重要作用。

通过本次对 HUVECs 的实验研究发现,细胞外基质刚度的改变,对 HUVECs 的生长周期和形态均有较为明显的影响。随着基底刚度的增加,对细胞

的生长具有明显的抑制作用,由此而对局部血管内皮细胞损伤后的修复等造成影响,从而诱导或促进局部血管内皮细胞功能的紊乱。

参 考 文 献

- [1] 杨永宗.动脉粥样硬化性心血管病基础与临床[M].2 版.北京:科学出版社,2009.
- [2] Yang Y Z.Atherosclerosis cardiovascular disease basic and clinical [M].2nd ed.Beijing:Science Press,2009.
- [3] Masugata H,Senda S,Okada H,et al.Association between arterial stiffness and pulmonary function in hypertensive patients[J].Hypertens Res,2012,35(4):388-392.
- [4] Raij L,Gonzalez-Ochoa A M.Vascular compliance in blood pressure[J].Curr Opin Nephrol Hypertens,2011,20(5):457-464.
- [5] Blacher J,Asmar R,Djane S,et al.Aortic pulse wave velocity as a marker of cardiovascular risk in hypertensive patients[J].Hypertension,1999,33(5):1111-1117.
- [6] Blacher J,Guerin A P,Pannier B,et al.Arterial calcifications,arterial stiffness,and cardiovascular risk in end-stage renal disease[J].Hypertension,2001,38(4):938-942.
- [7] Blacher J,Guerin A P,Pannier B,et al.Impact of aortic stiffness on survival in end-stage renal disease[J].Circulation,1999,99(18):2434-2439.
- [8] Mattace-Raso F U,van der Cammen T J,Hofman A,et al.Arterial stiffness and risk of coronary heart disease and stroke;the rotterdam study[J].Circulation,2006,113(5):657-663.
- [9] Herrington D M,Brown W V,Mosca L,et al.Relationship between arterial stiffness and subclinical aortic atherosclerosis[J].Circulation,2004,110(4):432-437.
- [10] Cohn J N,Duprez D A,Grandits G A.Arterial elasticity as part of a comprehensive assessment of cardiovascular risk and drug treatment[J].Hypertension,2005,46(1):217-220.
- [11] Libby P,Aikawa M,Jain M K.Vascular endothelium and atherosclerosis[J].Handb Exp Pharmacol,2006,176(Pt 2):285-306.
- [12] Virmani R,Kolodgie F D,Burke A P,et al.Lessons from sudden coronary death;a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions[J].Arterioscler Thromb Vasc Biol,2000,20(5):1262-1275.
- [13] Guthikonda S,Haynes W G.Homocysteine;role and implications in atherosclerosis[J].Curr Atheroscler Rep,2006,8(2):100-106.

(责任编辑:关蕴良)