

[文章编号] 1000-4718(2008)05-0905-04

低营养及低氧状态下 NIH3T3 细胞增殖及细胞周期的变化及对 bFGF 的影响*

马秋洁[#], 李萍[△], 赵京霞, 刘欣, 梁代英
(首都医科大学附属北京中医医院北京市中医研究所, 北京 100010)

[摘要] 目的: 体外模拟慢性创面缺氧、低营养环境, 观察成纤维细胞在该状态下增殖及细胞周期的变化及对外源性生长因子(bFGF)的反应, 探讨低氧、低营养条件下成纤维细胞的病理生理变化。方法: 单纯缺氧环境采用厌氧培养箱, 通入混合气, 氧分压(PO_2)分为 27 mmHg 和 44 mmHg 2 个水平; 低营养环境则控制培养液新生牛血清(NCS)浓度。用 MTT 法检测细胞活性以及其对外源性生长因子的反应, 用流式细胞仪检测细胞周期。结果: PO_2 44 mmHg 时细胞增殖速度较同期对照组无明显差异; PO_2 27 mmHg 时, 细胞增殖速度较同期对照组明显减慢($P < 0.01$), 细胞被阻滞于 G_0 期, S 期细胞比例明显减少, bFGF 未显示促增殖作用。NCS 浓度为 0.5% 的低营养状态下细胞增殖速度较同期对照组明显减慢($P < 0.01$), 细胞被阻滞于 $G_0 - G_1$ 期($P < 0.01$); bFGF 能明显改善低营养状态下的增殖减慢($P < 0.01$), 使 $G_2 - M$ 期细胞比例增加($P < 0.05$)。结论: 27 mmHg PO_2 或 NCS 浓度为 0.5% 的低营养环境使细胞阻滞于 $G_0 - G_1$ 期, 影响成纤维细胞增殖; bFGF 可以改善低营养条件下细胞增殖减慢的状态, 但对极度缺氧条件下的成纤维细胞增殖障碍无明显作用。

[关键词] 低营养; 低氧; NIH3T3 细胞; 成纤维细胞生长因子; 细胞周期

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

NIH3T3 cell proliferation and cell cycle in the conditions of hypoxia or low nutrition and its response to bFGF

MA Qiu-jie, LI Ping, ZHAO Jing-xia, LIU Xin, LIANG Dai-ying

(Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Capital University of Medical Sciences, Beijing 100010, China. E-mail: liping411@yahoo.com.cn)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate NIH3T3 cell proliferation and cell cycle in the condition of hypoxia or low nutrition and its response to bFGF, and to explore the pathophysiological changes of fibroblast under hypoxic or low nutritional conditions. **METHODS:** The cells were placed in anaerobic workstation where the mixture gas was given to simulate hypoxic environment. Partial oxygen pressure (PO_2) of medium was controlled in 27 mmHg, 44 mmHg and 175mmHg. NIH3T3 cells were cultured with low nutritional medium contained new bovine serum (NCS) less than 10% to simulate low nutritional environment. MTT assay was used for observing cell activity and flow cytometry for cell cycle analysis. **RESULTS:** Under 44 mmHg PO_2 , no obvious difference was shown between hypoxia group and normal group. Under 27 mmHg PO_2 , the proliferation activity of NIH3T3 cells was significantly lower than that in normal group ($P < 0.01$), as well as the cell numbers in $G_0 - G_1$ phase increased ($P < 0.05$), S phase decreased ($P < 0.01$). bFGF had no effect on cell proliferation. In 0.5% NCS medium, the NIH3T3 cell proliferation speed decreased ($P < 0.01$) and cell cycle was arrested at $G_0 - G_1$ ($P < 0.01$). The proliferation speed was improved by bFGF ($P < 0.01$). **CONCLUSION:** In lower PO_2 or lower nutritional condition, fibroblast proliferation activity is inhibited by cell cycle arrest in G_0/G_1 phase. However the decreasing proliferation in low nutritional medium could be improved by external bFGF.

[KEY WORDS] Low nutrient; Anoxia; NIH3T3 cells; Fibroblast growth factor; Cell cycle

慢性溃疡的原发病因虽然很多但其主要病理生理变化都与血管的病变有密切的关系, 局部微循环

[收稿日期] 2007-09-06 [修回日期] 2008-01-10

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30472258)

△通讯作者 Tel: 010-52176679 E-mail: liping411@yahoo.com.cn

#首都医科大学 2005 级在读硕士研究生

障碍造成了创面的低氧和低营养环境。成纤维细胞作为主要的修复细胞参与了创伤愈合的全过程,在其中起了十分重要的作用^[1]。成纤维细胞在慢性创面中的增殖发生障碍是直接影响创面愈合的重要原因之一。碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是对创伤修复具有重要调控作用的生长因子^[2,3],临床上可常见到 bFGF 的应用,但其临床疗效不甚满意^[4],提示慢性创面的成纤维细胞发生病理生理学变化,对外源性生长因子反应性降低。因此,本研究在体外模拟慢性创面低营养及低氧状态,观察成纤维细胞在该状态下的增殖及细胞周期的变化及对外源性 bFGF 的反应,探讨低氧及低营养条件下成纤维细胞的病理生理变化。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 主要试剂与仪器 DMEM 培养基(Gibco);新生牛血清(newborn calf serum, NCS, PAA);MTT(Sigma);胰蛋白酶;bFGF(Sigma);酶标仪(DigiscanSA1000);Olympus IMT 倒置显微镜;厌氧培养箱(BUG BOX anaerobic workstation)。流式细胞仪(BD);全自动血气分析仪(Bayer Rapidlad 800'S)。

1.2 细胞 NIH3T3 小鼠成纤维细胞瘤细胞株购于协和细胞中心。

2 方法

2.1 细胞培养 培养液为含 10% NCS 的 DMEM 培养基,将 NIH3T3 细胞接种于 25 cm² 培养瓶中,置于 37 °C、5% CO₂ 孵育箱内培养,生长汇合后用 0.125% 胰蛋白酶消化分离细胞。

2.2 缺氧环境建立 缺氧模型组置于厌氧培氧箱,分别通入混合气 1(2% O₂、5% CO₂、93% N₂)与混合气 2(5% CO₂、95% N₂),在 37 °C 恒温培养 48 h。正常对照组于 5% CO₂、37 °C 培养箱中继续培养,采用全自动血气分析仪监测培养液中氧分压。

2.3 低营养环境建立 参考 Monika 等^[5]方法模拟慢性创面的低营养环境,将细胞于 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养 18 h 后,先将原培养液吸弃,低营养组换含低浓度血清的 DMEM,对照组换 10% NCS 的 DMEM。于 5% CO₂、37 °C 培养箱中继续培养 48 h。

2.4 实验分组 正常培养组(control)、低营养组(low nutrient,培养液中 NCS 浓度分别为 2%、1% 和 0.5%)、低氧组(PO₂, PO₂ 分别为 44 mmHg 和 27 mmHg)、低营养 + 10 μg/L bFGF 组[low nutrient(培养液中 NCS 浓度分别为 2%、1% 和 0.5%) + 10 μg/L bFGF]、低氧 + 10 μg/L bFGF 组[PO₂(PO₂27

mmHg) + 10 μg/L bFGF]、低氧 + 40 μg/L bFGF 组[PO₂(PO₂27 mmHg) + 40 μg/L bFGF]。

2.5 细胞增殖的检测 将 NIH3T3 细胞用含 10% NCS DMEM 调整细胞浓度至 2 × 10⁷ cells/L,接种至 96 孔培养板,每孔 100 μL。5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中培养 18 h 后,更换培养基,bFGF 组加入无血清 DMEM 稀释的 bFGF:终浓度为 10 μg/L、40 μg/L;同时设立无细胞空白对照组(只加入无血清 DMEM)、无细胞 bFGF 对照组(无血清 DMEM 稀释的各浓度 bFGF)和细胞对照组(只加入无血清 DMEM),均设 6 个复孔,每个实验重复 3 次。培养 48 h 后,加入 MTT,每孔 20 μL。在 5% CO₂、37 °C 恒温培养箱中继续培养 4 h 后,加入 100 μL DMSO,轻轻振荡 1 min 后,用酶标仪在 570 nm 波长下测定 A 值。

2.6 细胞周期检测 将 NIH3T3 细胞用 0.125% 胰蛋白酶消化后,以相同密度接种于 6 孔板中,培养 18 h 后,更换培养基,加入无血清培养基稀释的药物 bFGF 终浓度为 10 μg/L。继续培养 48 h 后,消化、离心、清洗细胞并用 70% 冰乙醇固定,4 °C 保存。上机前离心去除乙醇,PBS 洗涤 3 次,各管弃上清后剩余 200 μL,混悬细胞后加入终浓度为 100 mg/L 的 RNase A,37 °C 孵育 40 min;继而加入终浓度为 50 mg/L 的 PI 染液,4 °C 避光染色 1 h,300 目纱网过滤,流式细胞仪检测分析。

3 统计学处理

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 软件进行两独立样本 *t* 检验,多组比较运用单因素方差分析。

结 果

1 缺氧对 NIH3T3 细胞增殖及细胞周期的影响

常氧条件下培养液氧分压为(175 ± 11) mmHg。通入混合气 1 于 BUG BOX 厌氧培氧箱,监测培养液氧分压约为(44 ± 3) mmHg,在此条件下细胞活性与常氧对照组无显著差异(*P* > 0.05),而通入混合气 2 于 BUG BOX 厌氧培氧箱,监测培养液氧分压为(27 ± 3) mmHg,NIH3T3 细胞在该条件下增殖速度较正常对照明显减慢(*P* < 0.01)。

常氧条件下,10 μg/L bFGF 有明显促进 NIH3T3 细胞增殖的作用(*P* < 0.01)。在极度缺氧条件下(PO₂27 mmHg),NIH3T3 细胞增殖受到抑制,进一步发现其细胞周期被阻滞于 G₀ 期,S 期比例明显下降(*P* < 0.01);10 μg/L bFGF 对细胞增殖无明显影响,加大浓度到 40 μg/L,仍不能改善细胞增殖抑制状态,见表 1、2、图 1。

表 1 bFGF 对 PO₂27 mmHg 条件下 NIH3T3 细胞增殖的影响

Tab 1 NIH3T3 cell proliferation in the condition of 27mmHg PO₂ and its response to bFGF(A. $\bar{x} \pm s$. n = 6)

Group	A value
Control	0.60 ± 0.07
Control + bFGF(10 μg/L)	0.81 ± 0.10**
PO ₂ (27 mmHg)	0.37 ± 0.04**
PO ₂ (27 mmHg) + bFGF(10 μg/L)	0.41 ± 0.03
PO ₂ (27 mmHg) + bFGF(40 μg/L)	0.39 ± 0.04

** P < 0.01 vs control group.

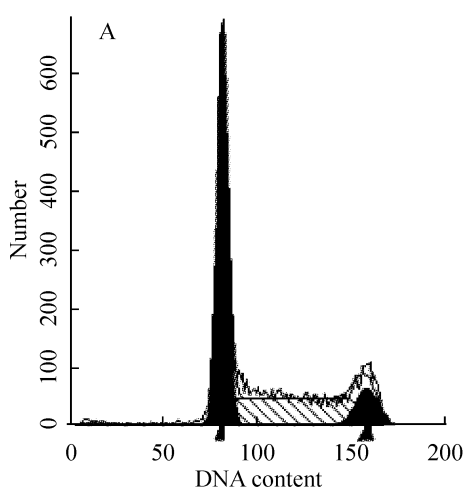


表 2 PO₂27 mmHg 条件下 NIH3T3 细胞周期的变化

Tab 2 NIH3T3 cell cycle in the condition of 27 mmHg PO₂ (%. $\bar{x} \pm s$. n = 4)

Group	G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M	PrI(S+G ₂ -M)
Control	58.10 ± 6.73	32.53 ± 6.07	9.44 ± 0.80	41.96 ± 6.81
PO ₂ (27 mmHg)	71.88 ± 8.58*	18.78 ± 2.59**	9.33 ± 6.75	28.11 ± 8.58*

* P < 0.05, ** P < 0.01 vs control group.

2 低营养对 NIH3T3 细胞增殖及细胞周期的影响

表 3 显示, NIH3T3 细胞在不同浓度血清培养 48 h 后, 只有含 0.5% NCS 或不含血清的低营养培养基使 NIH3T3 细胞增殖减慢 (P < 0.01), 因此选择 0.5% NCS 的低营养培养环境作为实验条件。

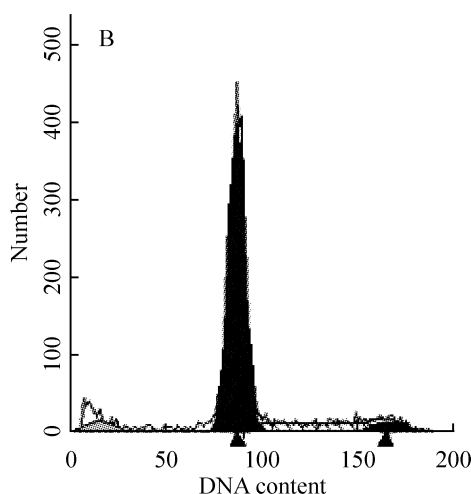


Fig 1 NIH3T3 cells DNA content analysis with FCM in the condition of 27 mmHg PO₂. A: control; B: hypoxia(PO₂ = 27 mmHg).

图 1 氧分压 27 mmHg 培养 48 h 后流式细胞仪分析 NIH3T3 细胞 DNA 含量

含 0.5% NCS 低营养培养使细胞周期被阻滞于 G₀ - G₁ 期 (P < 0.01), G₂ - M 期与 S 期比例均明显下降 (P < 0.01)。10 μg/L bFGF 有明显的促增殖作用 (P < 0.01), 使 G₂ - M 期比例增加, 见表 4、5、图 2。

讨 论

成纤维细胞作为主要修复细胞在创伤及组织修

表 3 不同血清浓度培养对 NIH3T3 细胞增殖的影响

Tab 3 NIH3T3 cell proliferation in the condition of different serum concentrations (A. $\bar{x} \pm s$. n = 6)

Group	A value
Control(10% NCS)	0.629 ± 0.056
Low nutrient (2% NCS)	0.626 ± 0.061
Low nutrient (1% NCS)	0.565 ± 0.057
Low nutrient (0.5% NCS)	0.508 ± 0.059**
Serum - free medium	0.383 ± 0.067**

** P < 0.01 vs 10% NCS group.

表 4 bFGF 对 0.5% NCS 低营养培养条件下 NIH3T3 细胞增殖的影响

Tab 4 NIH3T3 cells proliferation in the condition of 0.5% NCS and its response to bFGF(A. $\bar{x} \pm s$. n = 6)

Group	A value
Control	0.45 ± 0.04
Control + bFGF(10 μg/L)	0.64 ± 0.13**
Low nutrient(0.5% NCS)	0.15 ± 0.04**
Low nutrient(0.5% NCS) + bFGF(10 μg/L)	0.38 ± 0.05**

** P < 0.01 vs control group; ** P < 0.01 vs low nutrient group.

表 5 bFGF 对 0.5% NCS 低营养条件下细胞周期的影响

Tab 5 NIH3T3 cell cycle in the condition of 0.5% NCS and its response to bFGF (%. $\bar{x} \pm s$. n = 4)

Group	G ₀ -G ₁	S	G ₂ -M	PrI(S+G ₂ -M)
Control	55.22 ± 4.22	35.11 ± 3.88	9.76 ± 0.58	44.87 ± 4.33
Low nutrient(0.5% NCS)	80.45 ± 2.84**	13.53 ± 1.93**	6.00 ± 1.04**	19.52 ± 2.81**
Low nutrient(0.5% NCS) + bFGF(10 μg/L)	75.48 ± 2.79	16.44 ± 3.14	8.08 ± 0.46#	24.52 ± 2.79

** P < 0.01 vs control group; # P < 0.05 vs low nutrient group.

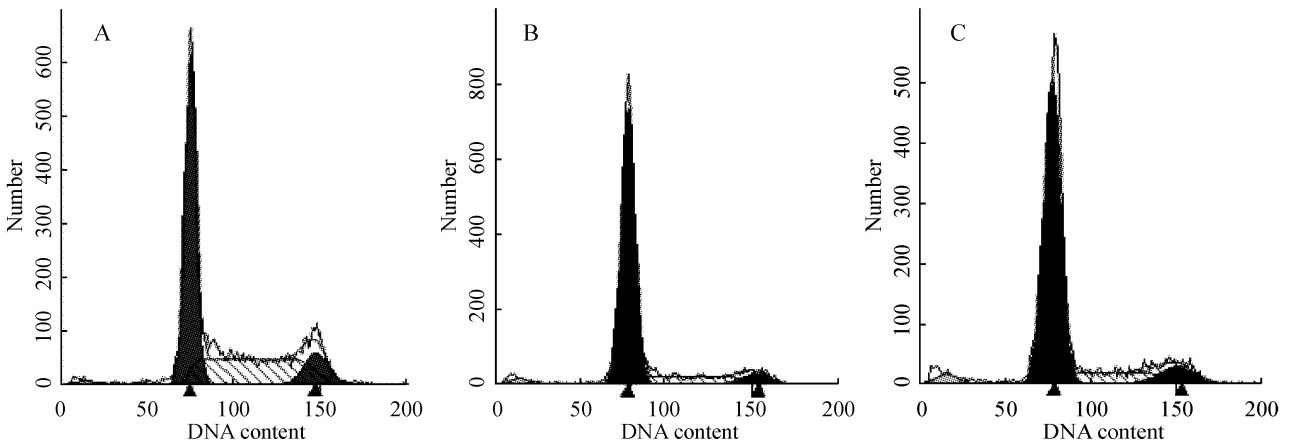


Fig 2 NIH3T3 cell DNA content analysis with FCM in the condition of low nutritional medium. A: control; B: low nutrient ; C: low nutrient + 10 $\mu\text{g/L}$ bFGF.

图2 低营养培养 48 h 后流式细胞仪分析 NIH3T3 细胞 DNA 含量

复中的数量及功能状态是决定和影响创面修复进程和预后的关键因素。bFGF 是对创伤修复具有重要调控作用的生长因子,研究表明, bFGF 作为 1 种重要的促有丝分裂原,它可以直接作用于组织修复细胞(如成纤维细胞)周期,使细胞 G_1 期比例下降, S 期和 $G_2 - M$ 期比例增加,使细胞周期转换时间缩短,加速细胞的分裂与增殖。临床上可见到各类生长因子的应用,如表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)、bFGF 等^[6],但是临床试用的效果并不好^[4]。近年来发现在溃疡创面分泌液或肉芽组织 bFGF、TGF- β 以及表皮细胞生长因子等含量并不减少,有时反而较正常增多^[7],提示这种高生长因子浓度状态下组织修复的延迟与因子总量多少无关,而可能与修复细胞增殖障碍有密切的关系。

一般认为在健康伤口内平均氧张力是 60 mmHg,而在血液灌流差的伤口氧张力常常为 0^[8],正常组织氧分压范围 35 - 45 mmHg^[9]。既往体外研究低氧环境只是控制气体环境中氧浓度,未能控制培养液中氧含量,而培养液氧分压才是真实反映细胞所处环境含氧量的可靠指标。本实验通过监测培养液氧分压,使低氧环境下培养液氧分压维持在 27 mmHg 左右,在该条件下 NIH3T3 细胞增殖明显减慢,对 bFGF 不敏感,结果表明成纤维细胞对生长因子的反应性降低和溃疡面局部组织低氧密切相关。

含 0.5% NCS 低营养培养液使 NIH3T3 细胞增殖明显减慢, bFGF 在一定程度上能改善低营养状态。本结果提示慢性创面的低营养环境可以被外源性 bFGF 改善,而慢性创面的修复改善局部的低氧环境才是关键;为临床采用高压氧的方法促进创伤修复提供理论依据,希望能为临床寻找进一步的治

疗方案提供线索。在低氧及低营养条件下成纤维细胞的病理生理变化以及对其它药物的反应有待进一步研究。

[参 考 文 献]

[1] 蒋 伟,王正国,赖西南. P 物质对肉芽组织成纤维细胞 bFGF 表达的调控作用及意义[J]. 中华烧伤杂志, 2003, 19(3): 159 - 162 .

[2] Sidhu GS, Singh AK, Thalloo RD, et al. Enhancement of wound healing by curcum in animals [J]. Wound Rep Reg, 1998, 6 (2): 167 - 177.

[3] Fu XB, Yang YH, Li XK, et al. Ischemia and reperfusion impair the gene expression of endogenous basic fibroblast growth factor (bFGF) in rat skeletal muscles [J]. J Surg Res, 1998, 80(1): 88 - 93.

[4] Werner S, Grouse R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines [J]. Physiol Rev, 2003, 83 (3): 835 - 870.

[5] Monika L, Wilfried B, Alexander H, et al. Serum depletion induces cell loss of rat cardiac fibroblasts and increased expression of extracellular matrix proteins in surviving cells [J]. Cardiovasc Res, 2001, 52(3): 429 - 437.

[6] 毕 擎,夏 冰,朱丹杰,等. 藻酸盐敷料与 mEGF 联合应用促进难愈性创面表皮干细胞增殖 [J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(11): 2253 - 2257.

[7] 付小兵,孙同柱,杨银辉,等. 碱性成纤维细胞生长因子和转化生长因子- β 在溃疡与增生性瘢痕组织中的表达及其对创面修复的影响 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2000, 14(5): 271 - 274.

[8] 付小兵,王德文. 创伤修复基础 [M]. 北京: 人民军医出版社, 1997. 167 - 183.

[9] 陈文彬,王友赤. 诊断学 [M]. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 549 - 562.