

基础研究 ·

表皮生长因子对 A 系小鼠胚腭突细胞增殖代谢的影响

孙晋虎 石冰 王大章

摘要 目的:研究不同剂量表皮生长因子(EGF)对 A 系小鼠胚腭突细胞增殖和 DNA、蛋白质及 PGE₂ 合成的影响。方法:实验分为 9 组,以平行 4 孔(瓶)为一组,在每组腭突细胞中分别加入 EGF 使其终浓度为 0.005 ng/ml,0.010 ng/ml,0.050 ng/ml,0.100 ng/ml,0.500 ng/ml,1.000 ng/ml,5.000 ng/ml,10.000 ng/ml,50.000 ng/ml,每组均设空白对照,在加入 EGF 并培养第 1、3、5 天后分别检测细胞的 OD 值、DNA、蛋白质和 PGE₂ 的含量。结果:EGF 可显著增加腭突细胞的 OD 值,促进 DNA 和 PGE₂ 合成,增大了细胞指数。EGF 含量在 0.005~10.000 ng/ml 浓度范围内,呈剂量依赖性,10.000 ng/ml 时 EGF 对腭突细胞增殖的作用最强。结论:EGF 显著刺激了 A 系小鼠胚腭突细胞分裂代谢,促进腭突细胞的增殖分化。

关键词 表皮生长因子 胚腭突 增殖代谢 细胞培养

Effects of Epidermal Growth Factors on the Proliferation and Metabolism of A/J Mouse Embryonic Palatal Cells

Sun Jinhua

The College of Stomatology, Guangxi Medical University

Shi Bing, Wang Dazhang

West China College of Stomatology, Sichuan University

Abstract

Objective: The purpose of this study was to investigate the effects of epidermal growth factors (EGFs) with different concentration on the OD, DNA, protein, and PGE₂ of A/J mouse embryonic palatal shelves cells (A/J MEPC) isolated from embryonic palatal shelves. **Methods:** The mouse embryonic palatal shelves cells were grown in different 39 pores (or bottles) with 9 gradient concentrations of EGF (0.005, 0.010, 0.050, 0.100, 0.500, 1.000, 5.000, 10.000, 50.000 ng/ml), and four pores were prepared for the same concentration, then the OD, DNA, protein and PGE₂ of A/J MEPC were measured after 1 day, 3 days and 5 days. **Results:** EGFs stimulated DNA and PGE₂ synthesis of A/J MEPC, and augmented proliferation index (PIX). Their effects were very obvious in promoting the proliferation of A/J MEPC, when the concentration was 10 000 ng/ml. **Conclusion:** EGF may be important in regulating proliferation and metabolism of embryonic palatal shelves cells.

Key words: epidermal growth factors cell culture proliferation and metabolism embryonic palatal shelves

细胞生长因子是调节腭突细胞和腭突生长发育的重要物质,了解各种细胞生长因子在腭突细胞增殖和分化中的作用,对阐明腭突生长发育过程、腭裂发生机制及预防腭裂发生的方法都具有十分重要的理论和实践意义^{1~3}。

本研究首次利用 A 系小鼠胚腭突细胞(腭突上皮和间充质细胞联合培养)培养模型,通过四唑盐比色实验、流式细胞光度术及放射免疫测定等实验技术,从剂量及时间效应两个方面,探讨了表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)对 A 系小鼠胚腭突细胞增殖、代谢的作用及特点。

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号 39600164)及高等学校优秀教师教学和科研奖励基金资助项目(1999)

作者单位:530021 广西医科大学口腔医学院(孙晋虎曾为四川大学华西口腔医学院博士研究生),四川大学华西口腔医学院(石冰,王大章)

1 材料和方法

1.1 材料

EGF(Gibco, USA), 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)

(Gibco, USA), DMEM/F-12 (dulbecco minimum essential medium/HamF-12) (Gibco, USA) 培养基, 异硫氰酸荧光素 (FITC, Sigma, USA), 碘化丙啶 (propidium iodide, PI) (Sigma, USA), 噻唑蓝 MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma, USA), 牛血清白蛋白 (Gibco, USA), PGE₂ 放射免疫分析试剂盒 (苏州医学院提供)。

1.2 A系小鼠胚腭突细胞的培养

取受孕时间 (gestation day, GD) 13 d 的 A 系小鼠胚胎腭突, 联合应用剪切及酶消化分离法, 获得高成活率的单细胞悬液, 接种于 DMEM/F-12 培养基中, 内含 10% FBS, 青霉素 100 u/ml, 链霉素 100 μg/ml, 抗坏血酸 10 μg/ml, 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度下培养备用, 按 3 × 10⁴ cells/ml, 定量接种于 96 孔培养板或 25 ml 培养瓶, 待培养 24 h 后, 更换不含血清培养基培养 12 h, 使细胞相对同步化。

1.3 实验分组

按 EGF 浓度分为 9 组, 分别用 10% 和 1% FBS 的 DMEM/F-12 培养液稀释 EGF, 使其终含量为 0.005 ng/ml, 0.010 ng/ml, 0.050 ng/ml, 0.100 ng/ml, 0.500 ng/ml, 1.000 ng/ml, 5.000 ng/ml, 10.000 ng/ml, 50.000 ng/ml, 每组平行 4 孔, 每组均设空白对照组, 培养 1、3、5 d 后用下列方法检测。

1.4 MTT法检测 A系小鼠胚腭突细胞生长增殖

按各实验组预定的实验时间结束实验时, 每孔加入 20 μl MTT (5 ng/ml), 再培养 4 h 后, 弃去培养液, 用无酚红的 Hanks 液洗涤培养孔 1 次, 弃去 Hanks 液, 每孔准确加入 200 μl 二甲基亚砜 (dimethylsulfoxide, DMSO), 将培养板振荡 10 min 后, 用酶标光度仪在 595 nm 波长下测定各孔的吸收光密度值 (OD 值), 进行定量分析。

1.5 流式细胞光度术检测腭突细胞 DNA 及蛋白质

弃去培养基, 用磷酸盐平衡液 (phosphate balance solution, PBS) 洗细胞后, 加入消化液, 将细胞制成单细胞悬液, 用 PBS 洗细胞 1 次, 250 g 离心 5 min, 弃上清液将细胞重悬于 5 ml 冰盐水中, 加入 20% 95% 乙醇 15 ml, 冰浴 30 min。在 37℃ 下, 用 RNA 酶液处理细胞 30 min, 蒸馏水洗 1 次, 用 FITC 染液染细胞 30 min, 离心, 弃上清, 蒸馏水洗 1 次。再用 PI 染液染 20 min, 冰浴, 离心弃上清, 蒸馏水洗 1 次, 并重悬于生理盐水中。用流式细胞光度计 (FCM) 检测, 氦离子激光激发波长 488 nm, DNA 被 PI 着色成红色荧光, 蛋白质被异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 着色成绿色荧光。打印出各组细胞周期 DNA 及蛋白质所占百分比, 并计算增殖指数 $PIX = \frac{S + G_2M}{G_0} \times \frac{G_1 + S + G_2M}{S + G_2M} \times 100\%$ 。

1.6 PGE₂ 放射免疫测定

严格按照 PGE₂ 放射免疫试剂盒 (radioimmunoassay kit, RIA kit) 说明书中的操作步骤进行, 样本为上述细胞培养液 (100 μl), 均作平行四管。在放射免疫计数器上检测其放射强度, 放免数据用放免数据软件分析处理, 应用 SPSS 软件对实验数据进行统计学分析, 采用 t 检验, P = 0.05。

1.7 统计分析

各实验组及对照组检测结果经统计学方差分析及均数两两比较, 分析不同含量组之间及不同处理组间差异是否有显著性。

2 结 果

2.1 EGF 对 A 系小鼠胚腭突细胞生长增殖的作用

在 A 系小鼠胚腭突细胞中加入不同浓度的 EGF, 对其增殖的促进作用亦不相同, 而且培养基体系中所含的 FBS 浓度不同亦影响 EGF 对腭突细胞的增殖效应。在含 10% FBS 的培养基体系中, EGF 在 0.005 ~ 10.000 ng/ml 浓度范围内, 对腭突细胞增殖作用呈剂量—效应关系, 超过 10.000 ng/ml 时, EGF 促细胞增殖作用减弱。在含有 1% FBS 培养基体系中, EGF 在 0.500 ng/ml 时促细胞增殖作用最大, 而且其整体促细胞增殖作用比其在 10% FBS 培养基体系中要低得多 (图 1)。

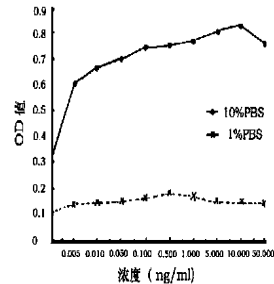


图 1 EGF 对鼠胚腭突细胞增殖代谢的剂量效应关系

Fig 1 The dosage-effect of EGF on the proliferation and metabolism of A/J MEPC

在鼠胚腭突细胞中加入 EGF 培养 24 h, EGF 对腭突细胞增殖影响不大, 但培养到 3 d、5 d 时, 可见细胞的 OD 值迅速增大, 其作用强度呈时间效应关系 (图 2)。

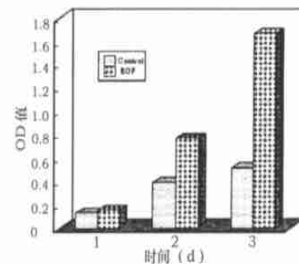


图 2 EGF 对鼠胚腭突细胞增殖代谢的时间效应关系

Fig 2 The time-effect of EGF on the proliferation and metabolism of A/J MEPC

2.2 EGF 对 A 系小鼠胚腭突 DNA 及蛋白质合成的影响

EGF 使 G₁ 期腭突细胞百分数降低, 增大了细

胞指数,促进了DNA合成。EGF促进细胞分裂增殖,使细胞内蛋白质含量较空白对照组降低(图3)。

2.3 EGF对A系小鼠胚腭突细胞PGE₂合成的影响

加入EGF培养1d后,细胞液PGE₂浓度较空白对照组腭突细胞培养液PGE₂的浓度显著增大,培养3d细胞液PGE₂浓度较空白对照组仍增大,但在EGF作用5d时,PGE₂浓度与对照组无显著差异,而空白对照组腭突细胞培养液PGE₂的浓度随培养时间增加而增大(图4)。

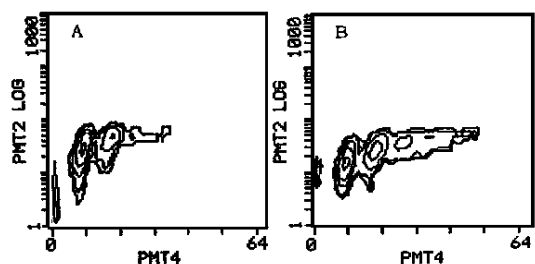


图3 EGF对鼠胚腭突细胞DNA和蛋白质含量的影响
A:对照组 B:EGF组
(PMT2 LOG:蛋白质含量的对数值;PMT4:DNA含量)

Fig 3 The effect of EGF on the DNA and protein content of A/J MEPC

A: control B:EGF(PMT2 LOG:log value of protein content ; PMT4:DNA content)

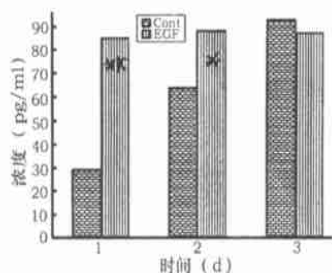


图4 EGF对鼠胚腭突细胞培养液PGE₂浓度的影响(**P<0.01, *P<0.05)

Fig 4 The effect of EGF on the concentration of PGE₂ of A/J MEPC culture medium(**P<0.01, *P<0.05)

3 讨 论

在腭突的抬起、融合过程中,腭间充质细胞合成丰富的细胞外基质,特别是糖胺聚糖和胶原是腭突得以抬起的动力库,而腭中嵴上皮(middle edge epithelial, MEE)细胞的正常转归消失,是使两侧腭突间充质细胞融合的关键步骤。

本研究表明EGF对腭细胞的增殖作用,是受多种因素制约影响的,高浓度血清可为腭突细胞增殖代谢提供更丰富的营养和其他多肽分子。但在EGF超过最佳效应浓度时,测得细胞OD值逐渐下

降,这提示EGF促生长作用降低,这可能与EGF-R的结合能力以及EGF-R数量调节有关,但是亦可能是由于EGF浓度过高,抑制了细胞生长因子网络中其他成员的作用。有研究证实⁴,人腭间充质细胞表达EGF-R,用EGF孵育腭间充质细胞后,腭细胞表面的EGF-R发生下降性调节。从EGF对腭细胞增殖的时间效应结果可以看出,EGF作用腭细胞第3天时,促进腭突细胞增殖的效应显著(P<0.01),培养后期,这种促增殖效应则明显下降,流式细胞仪检查结果亦证实了EGF促进腭突细胞增殖的效应。Crove等⁵证实,在含有2.5%血清的培养基中加入EGF可阻碍腭中嵴上皮细胞正常的退化转归,干扰腭突的融合导致腭裂畸形。

腭突体外实验表明小鼠腭间充质细胞可自身合成PGE₂⁶。本实验结果发现在EGF作用1d后,腭细胞PGE₂增加最为显著,但随着培养时间的延长,EGF促进PGE₂合成作用逐渐减弱。在PGE₂合成增加时,将导致细胞增殖代谢增强,加速腭中嵴上皮增殖分化,有可能阻碍了腭突的正常融合。

总之,EGF对A系小鼠胚腭突细胞的增殖及代谢,具有较大的影响,但这种影响存在明显的时间—剂量—效应关系,认识EGF的这种生物学特性,将有助于揭示在腭裂发生过程中两侧腭突融合障碍的病理机制。

参考文献

- Dixon MJ, Carner J, Ferguon MW. Immunolocalization of epidermal growth factor (EGF), EGF receptor and transforming growth factor alpha (TGF) during murine palatogenesis in vivo and in vitro. *Anat Embryol*, 1991, 184(1):83~91
- Pelton RW, Saxena B, Jones M, et al. Immunohistochemical localization of TGF₁, TGF₂, and TGF₃ in the mouse embryo: expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *J Cell Biol*, 1991, 115(4):1091~1105
- 孙晋虎,王大章,石冰. 细胞生长因子与腭发育. *国外医学口腔医学分册*, 1999, 26(2):92~94
- Yoneda T, Pratt R. Mesenchymal cells from the human embryonic palate are highly responsive to epidermal growth factor. *Science*, 1981, 213(7):563~565
- Grove RI, Pratt RM. Influence of epidermal growth factor and cyclic AMP on growth and differentiation of palatal epithelial cells in culture. *Dev Biol*, 1984, 106(2):427~437
- Jones JJ. Immunohistochemical localization of prostaglandins E and F_{2a} in the developing murine palate. *Teratology*, 1984, 29(1):38~44

(2001-07-18 收稿,2002-02-28 修回)

(本文编辑 王 晴)