

文章编号:1004-7220(2011)03-0232-08

## 细胞联合培养杯膜的孔径对血小板源性生长因子通透的影响

沈宝荣, 姜隽, 齐颖新, 姜宗来

(上海交通大学 力学生物学与医学工程研究所, 上海 200240)

**摘要:**目的 探讨细胞联合培养杯膜的孔径对生物大分子通透的影响,解决血管细胞分子力学生物学实验的关键技术问题。**方法** 以杯底 PET 膜孔径为 0.4  $\mu\text{m}$  和 1.0  $\mu\text{m}$  的两种型号细胞联合培养杯作为研究对象,将大鼠血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)和内皮细胞(endothelial cells, ECs)分别种植于联合培养杯底 PET 膜的内外侧面。实验分为 EC/VSMC 联合培养施加低切应力组、PET 膜未接种细胞静止组、PET 膜单侧接种细胞静止组和 PET 膜双侧接种细胞静止组。ELISA 检测低切应力组 ECs 侧和 VSMCs 侧培养液中血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor BB, PDGF-BB)含量,Western blotting 检测重组 PDGF-BB(rPDGF-BB)刺激后,各组细胞内信号转导分子 p-ERK1/2 和 p-Akt 以及核骨架蛋白 Lamin A 的表达变化。**结果** EC/VSMC 联合培养施加 0.5 Pa 层流低切应力 12 h 后,0.4  $\mu\text{m}$  联合培养杯 VSMCs 侧 PDGF-BB 浓度显著高于 ECs 侧。0.4  $\mu\text{m}$  和 1.0  $\mu\text{m}$  两种孔径的 PET 膜未接种细胞时,rPDGF-BB 上调了隔开培养细胞的 p-ERK1/2 和 p-Akt 表达,并下调 Lamin A 表达。PET 膜外侧面接种单层细胞时,rPDGF-BB 上调了对侧细胞的 p-ERK1/2 和 p-Akt 表达,并下调 Lamin A 表达。PET 膜内外侧面均接种细胞时,rPDGF-BB 仅能影响 0.4  $\mu\text{m}$  PET 膜同侧细胞的 p-ERK1/2、p-Akt 和 Lamin A 表达,对对侧细胞无明显作用;而 1.0  $\mu\text{m}$  PET 膜两侧细胞的 p-ERK1/2、p-Akt 和 Lamin A 表达无显著性差异。**结论** 两种有孔 PET 材料本身均允许生物大分子的通透,而细胞接种会影响有孔 PET 膜对生物大分子的通透。0.4  $\mu\text{m}$  孔径 PET 膜两侧均接种细胞时,对生物大分子的通透明显减弱,更接近于在体情况。

**关键词:** 切应力; 细胞培养; 内皮细胞; 血管平滑肌细胞; 血小板源性生长因子; 通透

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

### Effect from different pore sizes of co-culture inserts on the permeability of platelet-derived growth factor

SHEN Bao-rong, JIANG Jun, QI Ying-xin, JIANG Zong-lai (*Institute of Mechanobiology and Medical Engineering, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China*)

**Abstract; Objective** To investigate the effect from different pore sizes of co-culture inserts on the permeability of biomacromolecules through polyethylene terephthalate (PET) membrane so as to solve the key technology problem in mechanobiology experiment on vascular cells. **Methods** Inserts with 0.4  $\mu\text{m}$  and 1.0  $\mu\text{m}$  pores on the PET membrane were studied using flow chamber system. Low shear stress was subjected to the co-cultured system of endothelial cell (EC)/vascular smooth muscle cell (VSMC) and the concentration of platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) was detected by ELISA. Under the static condition, vascular cells were cultured on the plate (with no cell on PET membrane), on the outer side of PET membrane, and on the both sides of PET membrane, respectively. Then the recombinants PDGF-BB (rPDGF-BB) were added on the different sides of PET membrane. Western blotting was used to detect the change in expressions of p-ERK1/2, p-Akt and Lamin A after cells were stimulated by rPDGF-BB. **Results** After low shear stress subjection for 12 h, the concentration

收稿日期:2011-03-24; 修回日期:2011-03-29

基金项目:国家自然科学基金资助项目(10972140,30970703,10732070)。

通讯作者:齐颖新,Tel:(021)34204863;E-mail:qiyx@sjtu.edu.cn。

of PDGF-BB in the medium from VSMC-side was significantly higher than that from EC-side. rPDGF-BB passed through 0.4  $\mu\text{m}$  and 1.0  $\mu\text{m}$  pores on the PET membrane and modulated expressions of p-ERK1/2, p-Akt and Lamin A in cells cultured on the opposite side of PET membrane and cells cultured on the plate separately. When cells were cultured on the both sides of PET membrane, rPDGF-BB only stimulated cells cultured on the same side of 0.4  $\mu\text{m}$  pores on PET membrane, but had no specific effect on cells cultured on the opposite side. **Conclusions** PET membrane with both 0.4  $\mu\text{m}$  and 1.0  $\mu\text{m}$  pores was permeable to PDGF-BB, and cells cultured on the membrane could affect the permeability. The efficiency of PDGF-BB passing through 0.4  $\mu\text{m}$  pores was significantly repressed with cells cultured on the both sides, which was more similar to that *in vivo*.

**Key words:** Shear stress; Cell culture; Endothelial cells (ECs); Vascular smooth muscle cells (VSMCs); Platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB); Permeability

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 与内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 间信息交流在血管重建中发挥重要作用, 已成为血管力学生物学研究关注的新热点。以细胞联合培养杯构建的细胞共培养模型广泛应用于细胞间信息交流的分子机制研究<sup>[1-2]</sup>。该培养杯底部为厚 10  $\mu\text{m}$  的多孔聚酯纤维 (polyethylene terephthalate, PET) 膜, 这层 PET 膜类似于在体血管壁的内弹力膜, 种植于 PET 膜内侧和外侧两面的 VSMCs 与 ECs 可通过膜的微孔直接接触并交流血管活性物质<sup>[3]</sup>。EC/VSMC 联合培养模型可用于平行平板流动腔系统, 对 ECs 施加切应力刺激。该系统既保留了 ECs 和 VSMCs 的内在联系, 又考虑了其所处的力学环境, 很好地模拟了在体条件下 ECs 与 VSMCs 这两种细胞的位置关系和相互作用方式<sup>[3-4]</sup>, 因而被用于探讨不同切应力条件下 ECs 与 VSMCs 相互作用<sup>[3-4]</sup>、力学信号的细胞内信号转导机制<sup>[3-5]</sup>, 以及切应力和 VSMCs 对 ECs 增殖、凋亡、迁移等功能的协同作用<sup>[5-6]</sup> 等方面的研究。

在体研究发现, 自发性高血压大鼠模型<sup>[7]</sup> 和颈动脉部分结扎引起的低血流、低切应力大鼠模型<sup>[8]</sup>, 在血管重建过程中均伴有血管内弹力膜上窗孔直径显著减小, 并出现大分子物质, 如辣根过氧化物酶在大动脉壁内的异常分布<sup>[8]</sup>, 提示血管内弹力膜上窗孔直径的变化可能影响血管壁对多种生物大分子的通透。研究表明, 血小板源性生长因子 (platelet-derived growth factor BB, PDGF-BB) 和转化生长因子  $\beta 1$  (transforming growth factor  $\beta 1$ , TGF $\beta 1$ ) 两种生物大分子在 ECs 与 VSMCs 间信息交流中起重要作用, 并参与低切应力诱导的血管重建过程<sup>[4]</sup>。然而, 其通透是否受血管内弹力膜窗孔直径

变化的影响尚不清楚。

体外 EC/VSMC 联合培养模型中, PET 膜上孔径的作用与血管内弹力膜窗孔相似。目前, 有 3 种不同孔径的商品化的联合培养杯, 其 PET 膜上孔的直径分别为 0.4、0.8 和 1.0  $\mu\text{m}$ 。各个实验室在选择联合培养杯时往往是依照实验室的传统和习惯, 如本实验室<sup>[4,6]</sup> 和 Chien 实验室<sup>[3,5]</sup> 一直使用 0.4  $\mu\text{m}$  的联合培养杯。但是, 联合培养杯膜的不同孔径对生物大分子通透的影响如何, 是血管细胞分子力学生物学研究尚未解决的基础技术问题。

本文选用 BD Falcon 公司生产的 0.4  $\mu\text{m}$  和 1.0  $\mu\text{m}$  孔径两种型号的联合培养杯, 以细胞内信号转导分子 p-ERK1/2 和 p-Akt 以及核骨架蛋白 Lamin A 的表达变化检测细胞是否受到 PDGF-BB 刺激<sup>[4]</sup>, 探讨这两种孔径联合培养杯在 ECs 和 VSMCs 单层培养以及联合培养条件下, PET 膜孔径对生物大分子通透的影响, 以期今后正确选用联合培养杯, 开展血管力学生物学实验研究提供基础数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 血管内皮细胞和平滑肌细胞培养

采用酶消化法原代培养大鼠胸主动脉 ECs<sup>[9]</sup>。使用 vWF (von willebrand factor) 抗体 (1:200, Sigma 公司) 对 ECs 胞浆内 vWF 进行免疫荧光鉴定, 阳性着色 95% 以上的 2~4 代 ECs 用于本实验。

采用组织贴块法原代培养大鼠胸主动脉 VSMCs<sup>[10]</sup>。6~8 h 组织快贴壁后, 添加 4 mL VSMCs 培养液, 轻轻翻转培养瓶, 正置于 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱内继续培养。使用  $\alpha$ -肌动蛋白抗体 (1:200, Sigma 公司) 对 VSMCs 胞浆内丝状  $\alpha$ -肌动

蛋白进行免疫荧光鉴定,阳性着色95%以上的4~7代VSMCs用于本实验。

### 1.2 联合培养杯

本文使用的2种联合培养杯外形、材质均一致,杯底均为厚10 μm的PET膜。0.4 μm联合培养杯(BD Falcon公司,型号353090)PET膜含有密度为 $1.6 \times 10^6/\text{cm}^2$ ,直径为0.4 μm的孔;1.0 μm联合培养杯(BD Falcon公司,型号353102)PET膜含有密度为 $1.6 \times 10^6/\text{cm}^2$ ,直径为1.0 μm的孔。

### 1.3 实验分组

为检测两种孔径的联合培养杯在未接种细胞、单侧接种细胞和两侧均接种细胞时,联合培养杯对生物大分子PDGF-BB的通透,本实验分为EC/VSMC联合培养受力组、PET膜未接种细胞静止组、PET膜单侧接种细胞静止组和PET膜双侧接种细胞(EC/VSMC联合培养)静止组4组。

(1)EC/VSMC联合培养受力组(见图1(a)):将 $2 \times 10^5$ 个ECs种植于联合培养杯底PET膜的外面,6h细胞贴壁后翻转培养杯放入空白6孔培养板,加入ECs培养液,将 $2 \times 10^5$ 个VSMCs种植于杯底PET膜内面,静置培养,同步化后置于平行平板流动腔系统施加0.5 Pa层流低切应力。

(2)PET膜未接种细胞静止组(见图1(b)):①ECs//:将 $2 \times 10^5$ 个ECs种植于6孔培养板内,细胞贴壁后,放入空白联合培养杯,同步化后PDGF-BB

重组蛋白(PDGF-BB recombinant protein, rPDGF-BB)加在联合培养杯内腔;②VSMCs//:将 $2 \times 10^5$ 个VSMCs种植于6孔培养板内,细胞贴壁后,放入空白联合培养杯,同步化后rPDGF-BB加在联合培养杯内腔。

ECs//和VSMCs//组检测未接种细胞的联合培养杯PET膜对PDGF-BB的通透。

(3)PET膜单侧接种细胞静止组(见图1(c)):①ECs/:将 $2 \times 10^5$ 个ECs种植于联合培养杯底PET膜的外面,6h细胞贴壁后翻转培养杯放入空白6孔培养板内,同步化后rPDGF-BB加在联合培养杯内腔;②VSMCs/:将 $2 \times 10^5$ 个VSMCs种植于联合培养杯底PET膜的外面,6h细胞贴壁后翻转培养杯放入空白6孔培养板内,同步化后rPDGF-BB加在联合培养杯内腔。

ECs/和VSMCs/组检测单侧接种细胞的联合培养杯PET膜对PDGF-BB的通透。

(4)PET膜双侧接种细胞静止组(见图1(d)):①将 $2 \times 10^5$ 个ECs种植于联合培养杯底PET膜的外面,6h细胞贴壁后翻转培养杯放入空白6孔培养板,加入ECs培养液,将 $2 \times 10^5$ 个VSMCs种植于杯底PET膜内面,静置培养,同步化后将PDGF-BB封闭性抗体(PDGF-BB neutralizing antibody, PDGF-BB NAB)和rPDGF-BB依次加在联合培养杯VSMCs侧(联合培养杯内腔);②ECs和VSMCs分别种植于

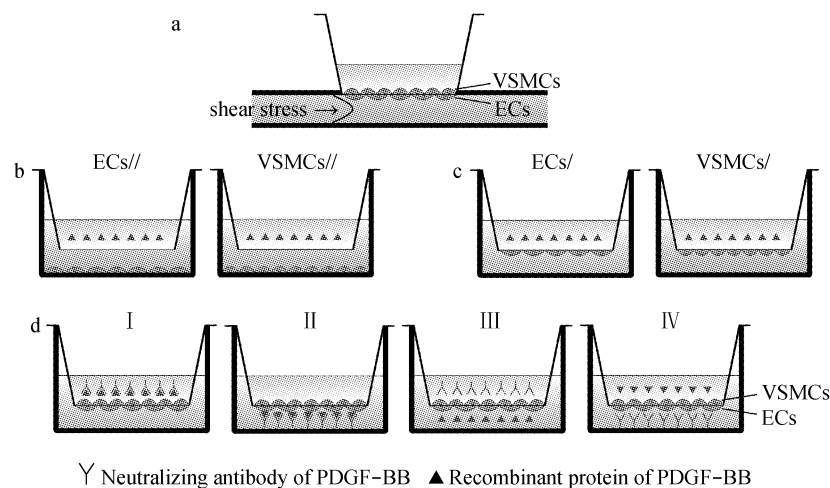


图1 实验分组示意图 (a) EC/VSMC联合培养受力组,(b)PET膜未接种细胞静止组,(c)PET膜单侧接种细胞静止组,(d)PET膜双侧接种细胞静止组

Fig.1 Schematic diagram of experiment groups (a) Shear stress group with cells on both sides of PET membrane, (b) Static group with no cells on PET membrane, (c) Static group with cells on the outer side of PET membrane, (d) Static group with cells on both sides of PET membrane

联合培养杯底外面和内面,方法同 I,同步化后将 PDGF-BB NAB 和 rPDGF-BB 依次加在联合培养杯 ECs 侧(6 孔培养板内);③ ECs 和 VSMCs 分别种植于联合培养杯底外面和内面,方法同 I,同步化后依次将 PDGF-BB NAB 加在联合培养杯 VSMCs 侧(联合培养杯内腔),rPDGF-BB 加在联合培养杯 ECs 侧(6 孔培养板内);④ ECs 和 VSMCs 分别种植于联合培养杯底外面和内面,方法同 I,同步化后依次将 PDGF-BB NAB 加在联合培养杯 ECs 侧(6 孔培养板内),rPDGF-BB 加在联合培养杯 VSMCs 侧(联合培养杯内腔)。

PET 膜双侧接种细胞静止组检测两侧均接种细胞后,联合培养杯 PET 膜对 PDGF-BB 的通透。

#### 1.4 酶联免疫吸附实验检测培养液中 PDGF-BB 浓度

EC/VSMC 联合培养施加 0.5 Pa 层流低切应力 12 h 后,分别吸取 ECs 侧和 VSMCs 侧培养液,应用 PDGF-BB Quantikine ELISA KIT(R&D 公司),酶标仪(Bio-Rad 公司,型号 680)读取各组样品 OD 450 nm 处吸光度数值,检测培养液中 PDGF-BB 浓度。

#### 1.5 PDGF-BB 封闭性抗体孵育和 PDGF-BB 重组蛋白刺激

细胞生长至 80% 融合后,使用不含血清的 DMEM(VSMCs)和 M199(ECs)培养液同步化细胞 12 h。单独培养组细胞加入 rPDGF-BB(R&D 公司,25 ng/mL)置于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 12 h,以不加重组蛋白的细胞为对照。联合培养组细胞预先加入 PDGF-BB NAB(R&D 公司,1 μg/mL)孵育 30 min,以封闭内源性 PDGF-BB,之后加入 rPDGF-BB(R&D 公司,25 ng/mL)置于 37 °C,5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养 12 h。

#### 1.6 蛋白免疫印记(western blot)

提取各组 ECs 和 VSMCs 总蛋白,用 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,每泳道蛋白上样量 30 μg。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,一抗分别为:p-ERK1/2(Thr202/Tyr204)多克隆抗体(Cell Signal Technology,1:500),t-ERK1/2 多克隆抗体(Cell Signal Technology,1:500),p-Akt(Ser473)单克隆抗体(Cell Signal Technology,1:500),t-Akt 多克隆抗体(Cell Signal Technology,1:500),Lamin A 多克隆抗体(Santa Cruz,1:500),GAPDH 多克隆抗体(San-

ta Cruz,1:500),4 °C 孵育过夜,碱性磷酸酶标记二抗(中杉金桥生物公司,1:1000)室温孵育 2 h,NBT/BCIP(KPL 公司)底物显色。使用 Quantity One(BIO-RAD 公司)分析软件进行蛋白质条带定量分析。

#### 1.7 统计学分析

实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  作为差异具有显著性的临界值。

## 2 结果

### 2.1 低切应力加载 12 h 后,0.4 μm 孔径的 PET 膜 VSMCs 侧 PDGF-BB 浓度高于 ECs 侧

联合培养 EC/VSMC 施加 0.5 Pa 层流低切应力 12 h 后,0.4 μm 联合培养杯内腔 VSMCs 侧培养液中 PDGF-BB 浓度显著高于灌流系统内 ECs 侧 PDGF-BB 浓度( $P < 0.05$ ,见图 2)。结果提示,低切应力条件下,生物大分子 PGFD-BB 不能顺利通过两侧分别接种 ECs 和 VSMCs 的 0.4 μm 联合培养杯 PET 膜。

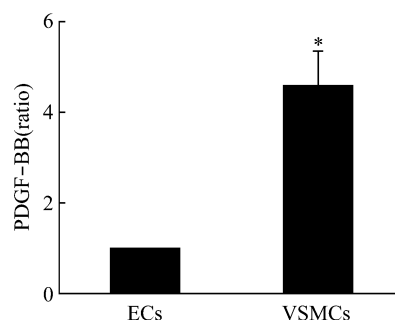


图 2 低切应力加载 12 h 后,0.4 μm 联合培养杯 VSMCs 侧培养液中 PDGF-BB 浓度高于 ECs 侧 PDGF-BB 浓度

Fig. 2 After low shear stress subjction for 12 h in 0.4 μm co-culture system, the concentration of PDGF-BB in the medium from VSMC-side was significantly higher than that from EC-side

### 2.2 rPDGF-BB 能透过未接种细胞的有孔 PET 膜

与未加入 rPDGF-BB 的对照组相比,在 0.4 μm 和 1.0 μm 联合培养杯内腔加入 rPDGF-BB,均能够诱导 6 孔板内 ECs 和 VSMCs 的 ERK1/2 和 Akt 磷酸化( $P < 0.05$ ),并下调 ECs 内核骨架蛋白 Lamin A 表达( $P < 0.05$ ),对 0.4 μm 组 VSMCs 内 Lamin A 表达的下调作用差异没有显著性( $P = 0.079$ )(见图 3)。结果提示,两种孔径的 PET 膜未接种细胞时,对生物大分子 PGFD-BB 均具有良好的通透性。

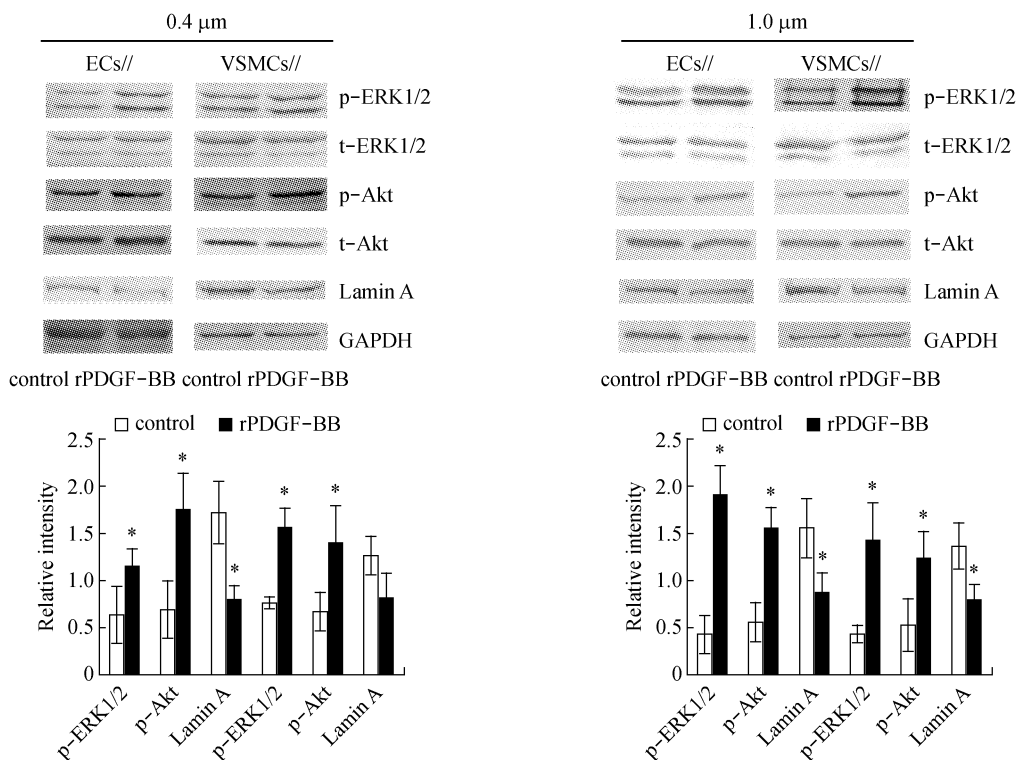


图3 rPDGF-BB 透过未接种细胞的有孔 PET 膜调控 6 孔板内 ECs 和 VSMCs 的 p-ERK1/2、p-Akt 和 Lamin A 表达

Fig.3 Transfusing through the pores in PET membrane, rPDGF-BB regulated expressions of p-ERK1/2, p-Akt and Lamin A in ECs and VSMCs without cells cultured

### 2.3 rPDGF-BB 能透过有孔的 PET 膜,影响对侧的细胞

与未加入 rPDGF-BB 的对照组相比,在 0.4 μm 和 1.0 μm 联合培养杯内腔加入 rPDGF-BB,均能够诱导 PET 膜外侧面种植的单层 ECs 和 VSMCs 的 ERK1/2 和 Akt 磷酸化,并下调 ECs 内核骨架蛋白 Lamin A 表达 ( $P < 0.05$ , 见图 4)。结果提示, rPDGF-BB 能够透过这两种孔径的 PET 膜,影响膜对侧的细胞。

### 2.4 PDGF-BB 未能透过两面接种细胞的 0.4 μm 孔径的 PET 膜,影响对侧细胞

0.4 μm 孔径的 PET 膜外侧面接种 ECs,内侧面接种 VSMCs 后,ECs 侧加入 rPDGF-BB 时,显著诱导 ECs 的 ERK1/2 和 Akt 磷酸化,并下调核骨架蛋白 Lamin A 表达 ( $P < 0.05$ , 见图 5, III),但对 PET 膜对侧 VSMCs 的 p-ERK1/2、p-Akt 和 Lamin A 表达无明显影响 ( $P > 0.05$ , 见图 5, III); VSMCs 侧加入 rPDGF-BB 时,上调 VSMCs 的 ERK1/2 和 Akt 磷酸化,并抑制核骨架蛋白 Lamin A 表达 ( $P < 0.05$ , 见图 5,

IV),但对 PET 膜对侧 ECs 无明显影响 ( $P > 0.05$ , 见图 5, IV)。

结果表明,联合培养杯内外两侧面均接种细胞时,0.4 μm 孔径的 PET 膜对生物大分子的通透明显降低。

### 2.5 PDGF-BB 能透过两面接种细胞的 1.0 μm 孔径的 PET 膜,影响对侧细胞

1.0 μm 孔径的 PET 膜内外侧面分别接种 VSMCs 和 ECs 后,各组间 ECs 和 VSMCs 的 p-ERK1/2、p-Akt 和 Lamin A 表达均无显著性差异 ( $P > 0.05$ , 见图 6)。

结果表明,生物大分子能够通过内外两侧面均接种细胞的 1.0 μm 孔径 PET 膜。

## 3 讨论

在体情况下,位于血管内膜单层排列的 ECs 与位于血管中膜的 VSMCs 由内弹力膜隔开。研究表明,内弹力膜上有许多微孔使得 ECs 和 VSMCs 能够通过直接接触和旁分泌作用相互交流信息<sup>[7,11]</sup>。为

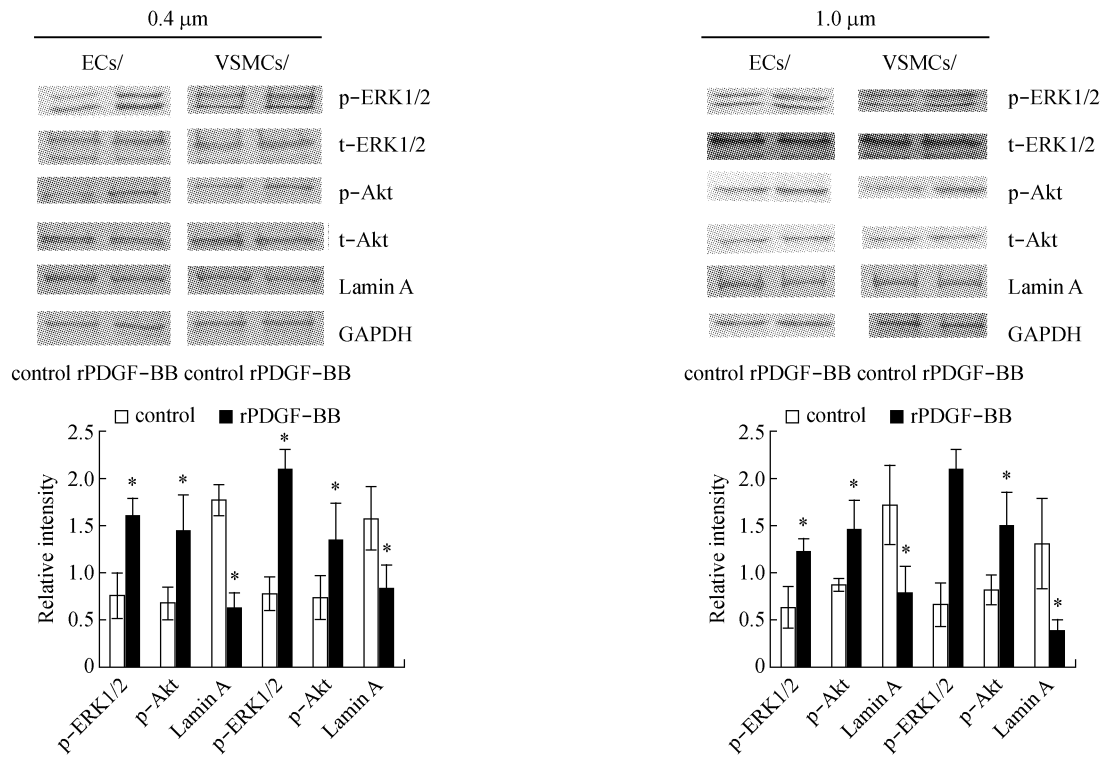


图4 rPDGF-BB 透过有孔 PET 膜调控对侧接种的单层 ECs 和 VSMCs 的 p-ERK1/2、p-Akt 和 Lamin A 表达

Fig.4 Transfusing through the pores in PET membrane, rPDGF-BB regulated expressions of p-ERK1/2, p-Akt and Lamin A in ECs and VSMCs cultured on the opposite side

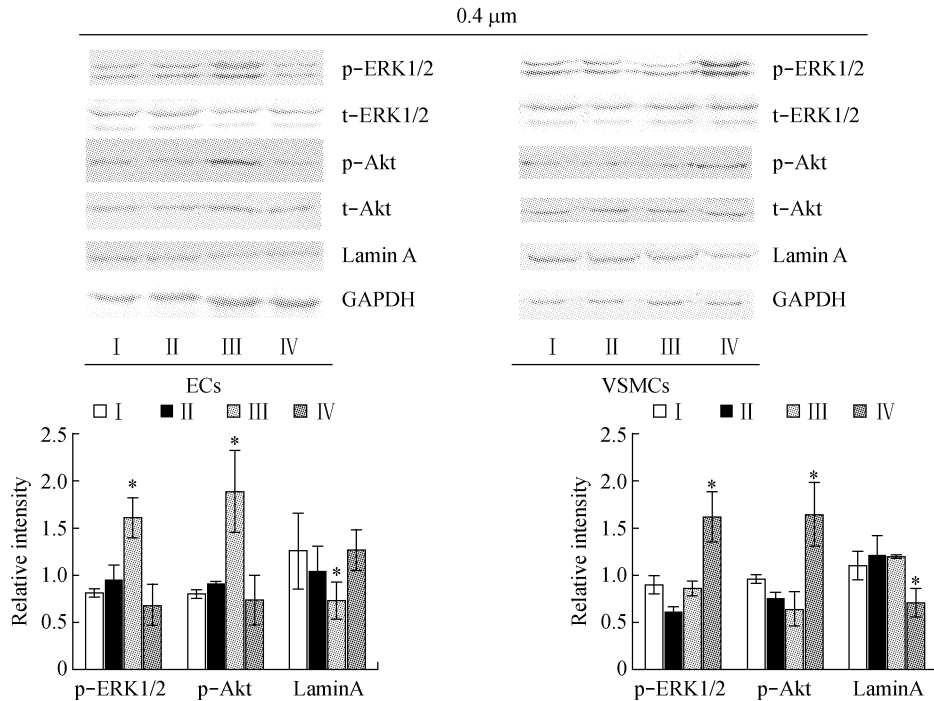


图5 0.4 μm 孔径的 PET 膜内外侧面均接种细胞后, rPDGF-BB 调控同侧细胞 p-ERK1/2、p-Akt 和 Lamin A 表达, 对对侧细胞无明显作用

Fig.5 When ECs and VSMCs were cultured on PET membrane with 0.4 μm pores, rPDGF-BB modulated expressions of p-ERK1/2, p-Akt and Lamin A on the same side, but had no specific effects on the opposite side

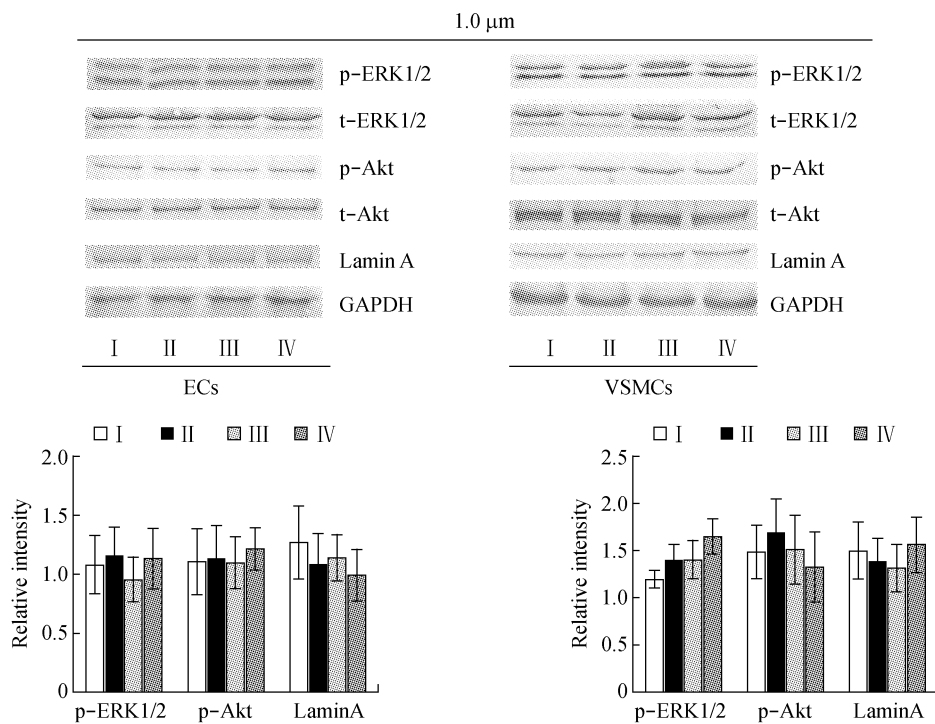


图6 1.0 μm 孔径的 PET 膜内外侧面均接种细胞后,各组细胞 p-ERK1/2、p-Akt 和 Lamin A 表达无明显变化

Fig. 6 When ECs and VSMCs were cultured on PET membrane with 1.0 μm pores, expressions of p-ERK1/2, p-Akt and Lamin A were similar in all groups

模拟这一特殊的生理结构,20 世纪 80 年代末出现了有孔 PET 材料构建的细胞联合培养模型,之后广泛应用于研究血管细胞间以及血液细胞与血管细胞间相互作用和信息交流。

应用平行平板流动腔系统,对本实验室一直使用 0.4 μm 孔径 EC/VSMC 联合培养模型施加 0.5 Pa 层流低切应力 12 h 后, VSMCs 侧培养液中 PDGF-BB 浓度显著高于 ECs 侧 PDGF-BB 浓度。引起上述现象的原因可能是由于 ECs 侧灌流液体积远大于 VSMCs 侧(联合培养杯内腔)培养液体积(60 mL: 2 mL),使得低切应力诱导的 ECs 合成释放 PDGF-BB 被稀释。培养杯两侧较高的 PDGF-BB 浓度差同时提示,0.4 μm 孔径联合培养内外侧面均接种细胞时对生物大分子的通透较低。因此可以推测,维持切应力条件下 0.4 μm EC/VSMC 联合培养模型两侧 PDGF-BB 浓度差的原因可能有 3 点:一是由于 PET 膜的材料本身影响生物大分子的通透(如材料的亲/疏水性以及材料荷电性等),二是由于 PET 膜上孔径的大小影响生物大分子的通过,三是由于膜上种植细胞后影响了联合培养杯内外两侧的物质

交流。了解有孔 PET 膜材料、膜上孔径大小和接种细胞情况对 PET 膜通透的影响,对于应用联合培养模型研究切应力条件下细胞间信息交流具有重要的基础意义。

有研究显示,联合培养杯置于 6 孔培养板内,可在联合培养杯底与 6 孔培养板底之间形成 100 μm 的空隙<sup>[5]</sup>。本研究结果显示,PDGF-BB 能够通过 PET 膜上的孔(0.4 μm 和 1.0 μm),影响 6 孔培养板底的细胞,PET 膜单侧接种细胞时,PDGF-BB 亦可透过这两种直径的孔影响对侧细胞,提示 PET 膜材料本身对于 PDGF-BB 生物大分子具有良好的通透性。此外,结果还提示,联合培养杯使用的最小孔径(0.4 μm)和最大孔径(1.0 μm)对 PDGF-BB 生物大分子均具有良好的通透性,这也与蛋白质化学研究揭示的 PDGF-BB(分子量为 27 kD)分子直径远远小于 0.4 μm<sup>[12]</sup> 相符合。

本实验进一步研究了有孔 PET 膜内外侧面均接种细胞后对生物大分子通透的影响。结果表明,0.4 μm 和 1.0 μm 两种孔径 PET 膜两侧均接种细胞后,对生物大分子的通透明显不同,PDGF-BB 透

过 0.4  $\mu\text{m}$  孔径 PET 膜影响对侧细胞的作用明显减弱,而 PDGF-BB 仍可顺利通过 1.0  $\mu\text{m}$  孔径 PET 膜作用于对侧细胞。提示 0.4  $\mu\text{m}$  孔径 PET 膜两侧种植细胞影响了 PET 膜两侧培养液内生物大分子的自由交换。这一现象与在体生理条件下血管内生物大分子不能通过自由扩散通过连续 ECs 屏障影响位于血管中膜的 VSMCs 相似。

上述实验提示,0.4  $\mu\text{m}$  孔径的联合培养模型可能更适用于研究切应力调控血管重建过程中 ECs 与 VSMCs 间信息交流,此时灌流系统与联合培养杯内腔的生物大分子不能通过自由扩散相互连通,PET 膜两侧的细胞间通过膜上 0.4  $\mu\text{m}$  小孔通过旁分泌作用影响相邻的对侧细胞,或形成细胞间的直接接触而相互作用;而 1.0  $\mu\text{m}$  孔径的联合培养模型可能更适用于 ECs 损伤引起内膜屏障受损等病理情况下的研究。

综上所述,有孔 PET 材料本身对于生物大分子具有良好通透性。当膜的内外表面均接种细胞时,0.4  $\mu\text{m}$  孔径 PET 膜对生物大分子的通透明显减弱,更接近于在体情况。本研究能够为正确选用联合培养模型探讨细胞间相互作用和信息交流等提供了基础实验数据。

#### 参考文献:

- [1] Powell RJ, Bhargava J, Basson MD, *et al.* Coculture conditions alter endothelial modulation of TGF-beta 1 activation and smooth muscle growth morphology [J]. *Am J Physiol*, 1998, 274(2 Pt 2): H 642-649.
- [2] Fillinger MF, O'Connor SE, Wagner RJ, *et al.* The effect of endothelial cell coculture on smooth muscle cell proliferation [J]. *J Vasc Surg*, 1993, 17(6): 1058-1068.
- [3] Chiu JJ, Chen LJ, Chen CN, *et al.* A model for studying the effect of shear stress on interactions between vascular endothelial cells and smooth muscle cells [J]. *J Biomech*, 2004, 37(4): 531-539.
- [4] Qi YX, Jiang J, Jiang XH, *et al.* PDGF-BB and TGF $\beta$ 1 on cross-talk between endothelial and smooth muscle cells in vascular remodeling induced by low shear stress [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(5): 1908-1913.
- [5] Chiu JJ, Chen LJ, Lee CI, *et al.* Mechanisms of induction of endothelial cell E-selectin expression by smooth muscle cells and its inhibition by shear stress [J]. *Blood*, 2007, 110(2): 519-528.
- [6] 姜晓华,姚庆苹,姜隽,等. 切应力与血管平滑肌细胞对内皮细胞增殖的影响及 TGF $\beta$ 1 与 p-Akt 信号通路在其中的作用 [J]. *医用生物力学*, 2010, 25(5): 316-320.  
Jiang XH, Yao QH, Jiang J, *et al.* Shear stress and vascular smooth muscle cells modulate the proliferation of endothelial cells via TGF $\beta$ 1 and p-Akt pathways [J]. *J Med Biomech*, 2010, 25(5): 316-320.
- [7] Boumaza S, Arribas SM, Osborne-Pellegrin M, *et al.* Fenestrations of the carotid internal elastic lamina and structural adaptation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats [J]. *Hypertension*, 2001, 37(4): 1101-1107.
- [8] Guo ZY, Yan ZQ, Bai L, *et al.* Flow shear stress affects macromolecular accumulation through modulation of internal elastic lamina fenestrae [J]. *Clin Biomech*, 2008, 23 (Suppl 1): 104-111.
- [9] Kwan HY, Leung PC, Huang Y, *et al.* Depletion of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores sensitizes the flow-induced  $\text{Ca}^{2+}$  influx in rat endothelial cells [J]. *Circ Res*, 2003, 92(3): 286-292.
- [10] Qi YX, Qu MJ, Long DK, *et al.* Rho-GDP dissociation inhibitor alpha downregulated by low shear stress promotes vascular smooth muscle cell migration and apoptosis: A proteomic analysis [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 80(1): 114-122.
- [11] Campbell GJ, Roach MR. Fenestrations in the internal elastic lamina at bifurcations of human cerebral arteries [J]. *Stroke*, 1981, 12(4): 489-496.
- [12] Jennings JA, Crews RM, Robinson J, *et al.* Effect of growth factors in combination with injectable silicone resin particles on the biological activity of dermal fibroblasts: A preliminary in vitro study [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2010, 92(1): 255-260.