

论著·基础研究

变性Ⅰ型胶原对内皮细胞增殖、迁移及血管形成相关蛋白合成的影响

苏荣家¹, 王志勇², 王西樵¹, 刘英开¹, 董叫云¹, 宋 菲¹, 陆树良¹

1. 上海市烧伤研究所, 上海 200025; 2. 上海交通大学医学院附属瑞金医院烧伤整形科, 上海 200025

[摘要] 目的·探讨变性Ⅰ型胶原对内皮细胞增殖、迁移及血管生成相关蛋白合成的影响。**方法**·人脐静脉内皮细胞传代培养后分别接种于正常胶原(正常胶原组)、半量正常胶原(半量胶原组)和变性胶原(变性胶原组)包被的培养板上, 2 d后用CCK-8法检测细胞增殖活性, 划痕实验观察细胞迁移能力, Western blotting检测膜型基质金属蛋白酶-1(membrane-type 1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP)和血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)蛋白表达水平, ELISA法检测血管生成素1(angiopoietin 1, Ang-1)和Ang-2的蛋白分泌情况。**结果**·CCK-8法检测结果显示, 变性胶原组细胞的增殖活性显著高于正常胶原组和半量胶原组(均P<0.05); 划痕实验结果显示, 变性胶原组细胞的迁移能力最强, 16 h即可将划痕基本完全覆盖。变性胶原组MT1-MMP和VEGF表达水平均明显高于其他2组(均P<0.05), Ang-2蛋白分泌量显著高于正常胶原组(P<0.05); 但Ang-1分泌与其他2组差异无统计学意义(P>0.05)。**结论**·变性Ⅰ型胶原能促进内皮细胞增殖、迁移, 增加MT1-MMP、VEGF、Ang-2的表达, 提示变性胶原在创面修复的血管化过程中可能有积极作用。

[关键词] 变性胶原; 内皮细胞; 增殖; 迁移; 血管生成

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.12.002 **[中图分类号]** R644 **[文献标志码]** A

Effect of denatured collagen type I on endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis-related proteins expression

SU Rong-jia¹, WANG Zhi-yong², WANG Xi-qiao¹, LIU Ying-kai¹, DONG Jiao-yun¹, SONG Fei¹, LU Shu-liang¹

1. Shanghai Burns Institute, Shanghai 200025, China; 2. Department of Burns and Plastic Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] Objective·To reveal the effect of denatured collagen type I on the endothelial cell proliferation, migration, and angiogenesis-related proteins expression. **Methods**·Human umbilical vein endothelial cells were cultured on the plates coated with normal collagen (normal collagen group), half concentration normal collagen (half collagen group) or denatured collagen (denatured collagen group). CCK-8 assay was performed to test cell proliferation ability two days later. The effect of collagen on cell migration was measured by scratch test. The expressions of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were detected by Western blotting. The expressions of angiopoietin 1 (Ang-1) and Ang-2 were measured by ELISA. **Results**·CCK-8 results showed that the proliferation activity of denatured collagen group was significantly higher than that of normal collagen group and half collagen group ($P<0.05$). Cell migratory capacity was increased in denatured collagen group, of which the scratch was almost covered after 16 h. The protein expressions of MT1-MMP and VEGF were significantly higher in denatured collagen group than those in the other two groups ($P<0.05$), in which the concentration of Ang-2 was also higher than that in normal collagen group ($P<0.05$). However, no significant difference was found in the concentration of Ang-1 among the three groups. **Conclusion**·Denatured collagen type I can promote proliferation, migration and MT1-MMP, VEGF, and Ang-2 expressions in endothelial cells, suggesting that collagen denaturation may play an active role in the process of angiogenesis during wound healing.

[Key words] denatured collagen; endothelial cell; proliferation; migration; angiogenesis

创面愈合是一个极其复杂而有序的生物学过程, 其表现为一种机体调控下具有高度有序性、完整性和网络性的生物学过程, 是多种细胞、炎症介质、生长因子和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)等成分的共同参与、协

调有序的组织生物学事件。ECM是由各种生物大分子构成的错综复杂而又精密的网络结构, 其中胶原作为ECM最主要 的结构成分, 不仅含量最多而且相互聚合、连接, 形成包含各种细胞成分的精密骨架。当组织损伤时, ECM

[基金项目] 国家自然科学基金(81071567, 30872686, 81000838) (National Natural Science Foundation of China, 81071567, 30872686, 81000838)。

[作者简介] 苏荣家(1988—), 男, 住院医师, 硕士; 电子信箱: sjtsrj@163.com。

[通信作者] 王志勇, 电子信箱: wzy10830@rjh.com.cn。



的成分及细胞识别位点发生改变, 暴露出某些隐藏的生物活性位点, 在损伤部位产生重要的信号, 调节细胞的生物学功能^[1]。很多研究^[2-5]表明, 胶原变性会影响细胞的生物学行为。内皮细胞是贴附于血管内壁的一层扁平的多形性细胞, 是血管内膜的主要成分, 参与调节多种血管生物学功能, 如调节血压和炎症反应、参与血栓和动脉粥样硬化的形成等^[6]。在创面愈合中内皮细胞同样发挥着重要职能。

本课题组的前期研究^[7]证明: 当温度升高至 50 ℃后, I 型胶原分子的二级结构发生明显改变, 并可对二维胶原的包被状态及三维胶原凝胶的力学性质均产生显著影响, 为研究变性胶原对细胞生物学行为的影响提供了理想的体外培养模型。本研究主要着眼于变性 I 型胶原对内皮细胞增殖、分泌等功能的影响, 探讨变性的 ECM 在烧伤愈合中的作用。

1 材料与方法

1.1 变性胶原溶液制备及胶原包被培养皿的准备

包被细胞培养皿采用的正常胶原溶液、半量胶原溶液浓度分别为 1.5 mg/mL 和 0.75 mg/mL, 以无菌的 0.006 mol/L 乙酸稀释 5 mg/mL 的鼠尾 I 型胶原溶液(杭州生友生物技术有限公司)得到。将 5 mg/mL 的 I 型胶原溶液置于 50 ℃水浴中 30 min 热处理变性^[7], 用无菌的 0.006 mol/L 乙酸稀释至 1.5 mg/mL, 并与浓度为 1.5 mg/mL 的正常胶原溶液等体积混匀制得变性胶原溶液。

将上述制备的正常胶原溶液、半量胶原溶液及变性胶原溶液, 按 6 孔培养板每孔 1 mL、96 孔培养板每孔 100 μL 包被培养板, 用于培养内皮细胞, 分别为正常胶原组、半量胶原组和变性胶原组。

1.2 内皮细胞复苏和传代

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)来自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC), 从中国科学院生物化学与细胞生物学研究所细胞库购得。

从液氮中取出细胞冻存管, 立即置于 37 ℃细胞复苏水浴锅中, 轻轻摇晃以利于冻存管内冻存液受热均匀并加速溶解, 直至冻存液完全溶解。加入含 10% 胎牛血清(Gibco 公司, 美国)的 DMEM 培养液(Gibco 公司, 美国), 反复吹打混匀后 176 × g 离心 3 min; 弃去上清液后重悬, 移至培养瓶中培养; 次日内皮细胞贴壁完全后更换细胞培养液。待内皮细胞生长接近融合时用 0.25% 含有乙二胺四乙酸(EDTA)的胰蛋白酶溶液(Gibco 公

司, 美国)消化, 收集细胞后以 10 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液重悬, 调整细胞浓度至 5×10^5 个/mL 左右, 传代培养。

1.3 细胞增殖活性检测

消化、制备内皮细胞单细胞悬液, 调整至 3×10^4 个/mL, 按每孔 100 μL 细胞悬液加入不同胶原溶液包被的 96 孔板, 5% CO₂、37 ℃培养箱中培养 48 h。每孔加入 10 μL CCK-8 试剂(同仁化学, 日本), 并与培养液充分混匀后再孵育 1 h。通过 SpectraMax190 酶标仪(Molecular Devices 公司, 美国)测定在 450 nm 波长处的吸光度值[D(450 nm)]。

1.4 划痕实验

3×10^4 个/mL 内皮细胞悬液按每孔 1 mL 接种于包被过的 6 孔板。待细胞贴壁并完全覆盖培养板后用 10 μL 无菌枪头尽量垂直于 6 孔板板底迅速滑动, 制造划痕。更换细胞培养液, 去除划痕时脱落的内皮细胞。放入 5% CO₂、37 ℃培养箱内继续培养, 分别于 0、4、8、12、16 h 拍照观察。

1.5 Western blotting

Western blotting 分析检测膜型基质金属蛋白酶-1(membrane-type 1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP)和血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)蛋白表达。在不同胶原蛋白溶液包被的培养板中培养内皮细胞 48 h, RIPA 强细胞裂解液(上海碧云天生物技术有限公司)作用 30 min 后取上清液进行蛋白定量。取 50 μg 总蛋白, 行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 湿法转膜至硝酸纤维素膜, 用 5% 牛血清白蛋白封闭 1 h。加入一抗工作液(VEGF 抗体及 MT1-MMP 抗体, 均购自英国 Abcam 公司, 稀释度为 1:1 000), 4 ℃孵育过夜; 加入 1:2 000 辣根过氧化物酶(HRP)偶联的二抗(Cell Signaling Technology, 美国), 室温下作用 1.5 h。化学发光法显影, 曝光。以相应蛋白条带的积分光密度值(integrating optical density, IOD)除以内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的 IOD 值, 所得结果表示目的蛋白的相对含量。

1.6 双抗体夹心亲和素-生物素复合 ELISA

1×10^5 个/mL 内皮细胞悬液以 1 mL/孔接种于包被不同胶原的 6 孔培养板中, 37 ℃细胞培养箱培养 24 h, 待细胞紧密贴壁并完全覆盖板底后, 弃去上清液并以预温 1 × PBS 轻轻洗涤, 每孔再加入不含胎牛血清的 DMEM 培



养液继续培养 24 h，收集上清液用于 ELISA 检测。用抗人血管生成素 1 (angiopoietin 1, Ang-1)、Ang-2 单克隆抗体包被酶标板，加入待测样品，随后添加生物素化抗人 Ang-1 或 Ang-2 抗体，形成酶联免疫复合物，再以 HRP 标记的链霉亲和素与生物素相互作用，而后加入酶底物 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB) (Ang-1) 或邻苯二胺 (OPD) (Ang-2)，最终以硫酸终止液终止反应，通过酶标仪检测 $D(492 \text{ nm})$ 值 (Ang-1) 和 $D(450 \text{ nm})$ 值 (Ang-2)；通过绘制标准曲线计算出待测样品中 Ang-1、Ang-2 的浓度。该实验委托上海森雄科技实业有限公司完成。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析，定量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示；多组间比较采用单因素方差分析，当差异具有统计学意义时采用 LSD 法进行两两比较。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

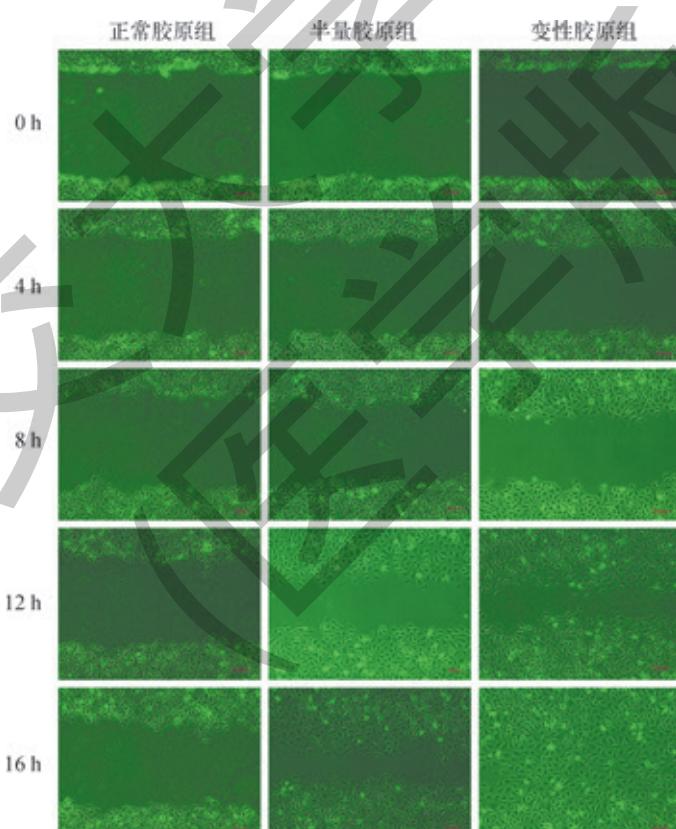
2 结果

2.1 内皮细胞增殖活性

于 3 种不同性质胶原包被的细胞培养板上接种内皮细胞 2 d 后，进行 CCK-8 细胞增殖活性检测。结果显示，正常胶原组 $D(450 \text{ nm})$ 值为 0.473 ± 0.111 ，半量胶原组为 0.704 ± 0.071 ，变性胶原组为 0.847 ± 0.166 ($n=14$, $P=0.000$)；正常胶原组细胞增殖活性显著低于半量胶原组和变性胶原组（均 $P=0.000$ ），半量胶原组显著低于变性胶原组 ($P=0.004$)。

2.2 内皮细胞迁移能力

划痕实验结果显示：变性胶原组的内皮细胞迁移能力最强，16 h 即可将划痕基本完全覆盖；接种于半量正常胶原表面的细胞迁移能力次之，而接种于正常胶原表面的血管内皮细胞迁移能力最弱（图 1）。



注：图中标尺为 100 μm

图 1 3 组内皮细胞的迁移能力（划痕实验， $\times 100$ ）

Fig 1 Cell migration of three groups of endothelial cells (scratch test, $\times 100$)

2.3 内皮细胞 MT1-MMP 和 VEGF 蛋白的表达情况

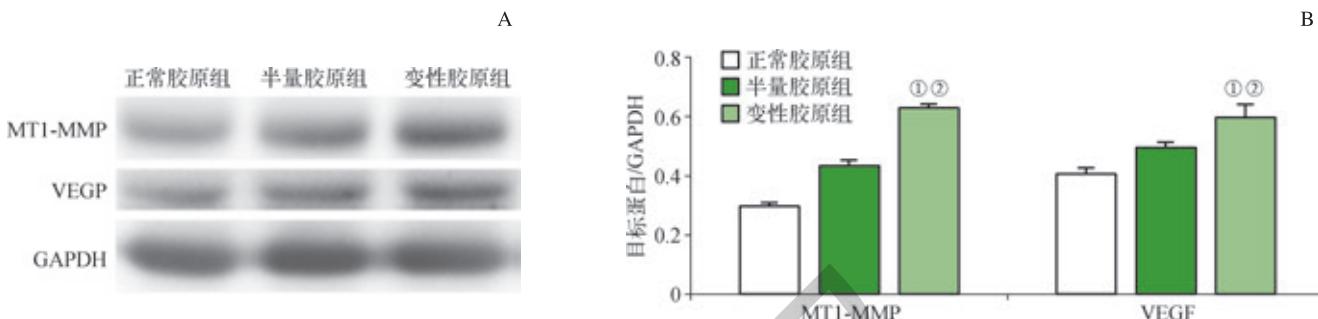
Western blotting 结果显示：MT1-MMP 蛋白相对分子质量约为 74 000，以 GAPDH 为内参，正常胶原组 MT1-

MMP 蛋白的相对表达水平为 0.301 ± 0.008 ，半量胶原组为 0.434 ± 0.015 ，变性胶原组为 0.629 ± 0.016 。变性胶原组 MT1-MMP 蛋白表达量最高，且与其他 2 组之间差异均

有统计学意义 ($n=5$, 均 $P=0.000$), 见图 2。

VEGF 蛋白相对分子质量约为 42 000, 正常胶原组 VEGF 蛋白相对表达水平为 0.408 ± 0.019 , 半量胶原组为

0.497 ± 0.014 , 变性胶原组为 0.596 ± 0.046 。变性胶原组 VEGF 蛋白表达量最高, 且与其他 2 组差异均有统计学意义 ($n=5$, 均 $P=0.000$), 见图 2。



注: A. Western blotting 蛋白条带; B. 蛋白相对表达量的比较。^① $P=0.000$, 与正常胶原组比较; ^② $P=0.000$, 与半量胶原组比较

图 2 3 组内皮细胞 MT1-MMP 和 VEGF 的蛋白表达水平

Fig 2 Protein expressions of MT1-MMP and VEGF in three groups of endothelial cells

2.4 内皮细胞分泌 Ang-1、Ang-2 蛋白的情况

ELISA 结果显示: 变性胶原组 Ang-1 表达量最高, 但 3 组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。3 组间 Ang-2 蛋白表达量差异有统计学意义 ($P<0.05$), 变性胶原组显著高于正常胶原组 ($P<0.05$) (表 1)。

表 1 3 组内皮细胞分泌 Ang-1、Ang-2 蛋白的情况比较 (ELISA 法)
Tab 1 Comparison of the secretion of Ang-1 and Ang-2 by endothelial cells in three groups (ELISA)

组别	n	Ang-1/(ng/mL)	Ang-2/(ng/mL)
正常胶原组	7	0.164 ± 0.017	1.108 ± 0.842
半量胶原组	7	0.171 ± 0.023	2.044 ± 0.632
变性胶原组	7	0.184 ± 0.021	$3.596 \pm 0.933^{\circ}$
F 值		1.71	10.76
P 值		0.209	0.001

注: ^① $P=0.000$, 与正常胶原组比较

3 讨论

组织损伤修复过程可分为炎症反应、细胞增殖、组织成熟和重建三个阶段。血管是炎症反应阶段炎症细胞到达损伤部位的必经通路, 并可为损伤组织中修复细胞等提供必需的养分, 运出损伤组织局部代谢废物, 是创伤修复过程的重要构成部分; 而内皮细胞是血管形成的主要参与者, 其可通过出芽、迁移、增殖、管腔形成并相互融合形成新生血管网^[8]。胶原作为 ECM 主要的结构成分, 参与组织器官形态发生、代谢更新、损伤修复等各种生物学过程。胶原分子三股螺旋结构相对稳定, 但在酶解、受热等因素作用下则可发生结构改变甚至解聚从而暴露其分子内部的隐

藏位点(隐藏位点是表达于蛋白、黏多糖等分子前体及功能体内部并不与外界接触, 而当分子结构发生改变或破坏时暴露的生物活性部位)^[1]。Davis^[9]最早提出, 胶原变性后结构改变导致的隐藏位点 RGD (Arg-Gly-Asp) 的暴露很可能是组织接受损伤刺激并向细胞传递损伤信号的一个重要环节。我们以往的实验^[10]也证明, 变性胶原能诱导成纤维细胞向肌成纤维细胞分化。内皮细胞也是参与创面修复的重要细胞之一。本研究中, 变性胶原组内皮细胞增殖活性较正常胶原组显著升高, 证明变性胶原较正常胶原更有利于内皮细胞增殖。划痕实验是检测细胞迁移能力的经典实验, 我们的结果发现, 接种于变性胶原的内皮细胞迁移能力最强, 16 h 即可将划痕基本完全覆盖。无论是内皮细胞募集, 还是其增生出芽、新生血管延伸都需血管内皮细胞迁移, 内皮细胞迁移能力越强, 预示着血管生成越旺盛。实验提示胶原变性后分子结构的改变可能可以提供刺激内皮细胞增殖和迁移的信号, 有利于血管形成。

内皮细胞变构降解血管基底膜是血管新生的起始步骤, 而且随后于组织间隙的迁移都将受到 ECM 阻碍。酶解 ECM 成分的能力也是衡量血管生成能力的重要指标。基质金属蛋白酶在血管发生、损伤修复、组织重塑等多种生理病理过程中发挥重要作用^[11]; 其中 MT1-MMP 是一种跨膜蛋白, 参与细胞与 ECM 直接接触, 能酶解 ECM 的绝大多数组分。而 VEGF 可由损伤、缺氧等引发的炎症反应诱导分泌, 是内皮细胞及其始祖细胞的有效趋化因子, 可动员骨髓内皮始祖细胞向炎症部位聚集、分化, 形成新的血管^[12]; 新生血管组建基本完成且形成管腔后, VEGF 还能招募组织间隙周细胞包绕新生血管^[13], 参与新生血管稳定、成熟。由此可见, VEGF 参与多种形式的血管生



成，并可参与血管生成的各个阶段，是调节血管形成的一个至关重要的生长因子。血管生成素也是参与血管形成的重要因子^[14-15]。其中 Ang-1 主要由非内皮细胞如周细胞、血管平滑肌细胞、成纤维细胞等间充质细胞分泌，以旁分泌的形式发挥调节作用；Ang-2 则主要由内皮细胞表达，并存储于 Weibel-Palade 小体内，当内皮细胞激活时其表达量急剧上升^[16]。本研究中，变性胶原组的 MT1-MMP、

VEGF 及 Ang-2 表达均明显增加，提示变性胶原分子结构的改变可能将损伤信号传递给内皮细胞，增强与新生血管生成相关的细胞因子及蛋白酶的分泌，从而可能在创面修复的血管化过程中发挥积极作用。

综上所述，本研究发现变性 I 型胶原能促进内皮细胞增殖和迁移，促进血管生成相关的酶和细胞因子的释放，提示变性的 ECM 在烧伤后创面修复中具有重要的作用。

参·考·文·献

- [1] Davis GE, Bayless KJ, Davis MJ, et al. Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules[J]. Am J Pathol, 2000, 156(5): 1489-1498.
- [2] Gowen BB, Borg TK, Ghaffar A, et al. Selective adhesion of macrophages to denatured forms of type I collagen is mediated by scavenger receptors[J]. Matrix Biol, 2000, 19(1): 61-71.
- [3] Elliott JT, Woodward JT, Langenbach KJ, et al. Vascular smooth muscle cell response on thin films of collagen[J]. Matrix Biol, 2005, 24(7): 489-502.
- [4] Volloch V, Kaplan D. Matrix-mediated cellular rejuvenation[J]. Matrix Biol, 2002, 21(6): 533-543.
- [5] Abraham LC, Dice JF, Lee K, et al. Phagocytosis and remodeling of collagen matrices[J]. Exp Cell Res, 2007, 13(5): 1045-1055.
- [6] Murikipudi S, Methe H, Edelman ER. The effect of substrate modulus on the growth and function of matrix-embedded endothelial cells[J]. Biomaterials, 2013, 34(3): 677-684.
- [7] 苏荣家, 王志勇, 刘英开, 等. 变性胶原体外培养模型的建立[J]. 中华创伤杂志, 2013, 29(4): 353-358.
- [8] Chan LK. Current thoughts on angiogenesis[J]. J Wound Care, 2009, 18(1): 12-14, 16.
- [9] Davis GE. Affinity of integrins for damaged extracellular matrix: $\alpha_5\beta_3$ binds to denatured collagen type I through RGD sites[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1992, 182(3): 1025-1031.
- [10] 王志勇, 王西樵, 刘英开, 等. 变性 I 型胶原在人成纤维细胞向肌成纤维细胞分化中的作用[J]. 中华烧伤杂志, 2018, 34(2): 96-101.
- [11] Arroyo AG, Iruela-Arispe ML. Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response[J]. Cardiovasc Res, 2010, 86(2): 226-235.
- [12] Dvorak HF, Detmar M, Claffey KP, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: an important mediator of angiogenesis in malignancy and inflammation[J]. Int Arch Allergy Immunol, 1995, 107(1/2/3): 233-235.
- [13] Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis[J]. Pharmacol Rev, 2004, 56(4): 549-580.
- [14] Suri C, Jones PF, Patan S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis[J]. Cell, 1996, 87(7): 1171-1180.
- [15] Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis[J]. Science, 1997, 277(5322): 55-60.
- [16] Felcht M, Luck R, Schering A, et al. Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling [J]. J Clin Invest, 2012, 122(6): 1991-2005.

[收稿日期] 2019-04-03

[本文编辑] 瞿麟平

