

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ РОСТА (bFGF и PDGF) НА СЕКРЕЦИЮ УРОКИНАЗЫ ГЛАДКОМЫШЕЧНЫМИ КЛЕТКАМИ

С.А. МУХИНА*, В.В. СТЕПАНОВА**, М.Ю. МАТВЕЕВ**, С.П. ДОМОГАТСКИЙ**, В.А. ТКАЧУК**

*Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова. 119899, Москва, Воробьевы горы;

**Российский Кардиологический Научно-производственный Комплекс Министерства здравоохранения РФ, 121552, Москва, 3я Черепковская ул., 15а Факс: (095) 414-67-19

На культуре гладкомышечных клеток меди аорты крысы была изучена секреция урокиназы под действием факторов роста bFGF и PDGF BB. При измерении содержания урокиназы с помощью метода ИФА наблюдалась двухфазная динамика секреции урокиназы с быстрым повышением “кажущейся” концентрации урокиназы до 12,5 пМ в первые 1-2 мин., а также более плавным повышением до 5,8 пМ к тридцатой минуте, и резким снижением “кажущейся” концентрации урокиназы до значений менее базального уровня к пятой минуте после начала стимуляции клеток факторами роста. Кинетика секреции урокиназы была сходна при стимуляции клеток как PDGF BB, так и bFGF, но количество секретированной урокиназы было больше в случае использования PDGF BB. Показано, что снижение содержания урокиназы в культуральной среде обусловлено не связыванием этого белка с клетками или межклеточным матриксом, а может объясняться уменьшением свободной формы урокиназы за счет образования комплекса с фактором, также секретируемым гладкомышечными клетками при стимуляции факторами роста. Установлено, что данный фактор не является ингибитором активаторов плазминогена - ИАП-1.

Ключевые слова: урокиназа, факторы роста, гладкомышечные клетки.

Используемые сокращения: PDGF - фактор роста из тромбоцитов (Platelet Derived Growth Factor); bFGF - основной фактор роста фибробластов (basic Fibroblast Growth Factor); ИАП-1 - ингибитор активаторов плазминогена первого типа; БСА - бычий сывороточный альбумин; FBS - эмбриональная сыворотка быка (Fetal Bovine Serum).

ВВЕДЕНИЕ. Урокиназа является одним из ключевых ферментов фибринолиза. Содержание урокиназы в плазме крови человека составляет около 1-5 нг/мл [1, 2]. При тромбозах и повреждении сосудов происходит накопление урокиназы в стенке сосуда, возможно, за счет синтеза и секреции урокиназы из гладкомышечных и эндотелиальных клеток [3]. Механизмы стимуляции секреции урокиназы неизвестны. Показано, что синтез урокиназы в гладкомышечных и эндотелиальных клетках стимулируется под действием факторов роста bFGF и PDGF [4, 5]. Достоверное повышение уровня этого фермента в клетке наблюдался 12 часов спустя после воздействия фактора роста [4]. В то же время, известно, что фибринолизис стимулируется в первые же минуты и часы после формирования тромба. Начало фибринолизиса хорошо коррелирует с появлением в области тромба или повреждения сосуда факторов роста, главным образом, PDGF, секретируемого тромбоцитами и гладкомышечными клетками [6], и bFGF, секретируемого эндотелиальными

клетками [7]. Поскольку клетки крови и сосудов, синтезирующие урокиназу, имеют рецепторы к этим факторам роста [8], можно предположить, что bFGF и PDGF стимулируют секрецию урокиназы.

Помимо урокиназы, клетки крови (главным образом, тромбоциты) и сосудов способны синтезировать и секретировать ряд регуляторов каталитической активности урокиназы. Например, тромбоциты при активации могут секретировать так называемый ингибитор активаторов плазминогена первого типа (ИАП-1) [9]. bFGF и PDGF также способны вызывать из гладкомышечных и эндотелиальных клеток секрецию этого ингибитора [10]. ИАП-1 - это одноцепочечный гликопротеин с молекулярным весом $50\,000 \pm 2\,500$ КДа [11], который может существовать как в активной, так и в латентной форме, не способной связываться с урокиназой [12, 13]. Урокиназа и активная форма ИАП-1 образуют эквимольный комплекс, в котором протеаза утрачивает способность взаимодействовать с субстратом (плазминогеном) [14] и быстро эндоцитируется [15]. Кроме ИАП-1, известно еще несколько ингибиторов урокиназы: ИАП-2 и протеаза нексин-1. Возможно, что помимо этих ингибиторов, существуют другие белки, обеспечивающие вывод урокиназы из кровотока или маскирующие протеазу, так как после секреции (или инъекции) в кровь уровень детектируемой антителами урокиназы снижается на 50%.

В данной работе исследована секреция урокиназы культивируемыми гладкомышечными клетками под действием факторов роста (PDGF BB и bFGF) в коротких временных интервалах (1 - 60 мин) и исследовано ее взаимодействие с гладкомышечными клетками и секретируемыми белками.

МЕТОДИКА. *Культивирование клеток.* Культуру гладкомышечных клеток меди аорты крысы выращивали в пластиковых чашках Петри в инкубаторе при 37°C и концентрации CO_2 5% в среде DMEM, содержащей глутамин 4 мМ, HEPES (pH 7,3) 20 мМ, пенициллин 100 ед/мл, стрептомицин 100 ед/мл и 10% эмбриональную сыворотку быка (FBS). Иммуногистохимическую характеристику выделенных клеток (позитивных по специфичному для гладкомышечных клеток α -актину и негативных по фактору VIII) проводили на первичной культуре. Клетки пассировали, обрабатывая раствором 0,25% трипсина и 0,02% ЭДТА. В эксперименте использовали клетки 18-21 пассажей.

Для изучения секреции урокиназы гладкомышечные клетки были посажены на 24-луночные плашки в среде DMEM/10% FBS (10^4 клеток на лунку). После достижения состояния конfluence (3,3 $\times 10^5$ клеток/лунку) клетки были переведены на бессывороточную среду DMEM/0.1% БСА (0,5 мл на лунку) на 1-2 суток. Перед добавлением факторов роста среду заменяли на новую DMEM/0.1% БСА по 200 мкл на лунку и выдерживали клетки в течение 1 часа. Факторы роста (PDGF BB и bFGF) были добавлены в конечной концентрации 50 нг/мл. После определенного времени инкубации клеток с фактором роста среду отбирали, в пробы добавляли апротинин в конечной концентрации 100 ед/мл и замораживали в жидком азоте. Пробы хранили при температуре -80°C .

Измерение количества урокиназы. Количество урокиназы в образцах измеряли с помощью разработанного метода ИФА с пределом чувствительности 2 пМ. Для этого 96-луночные плашки были покрыты антителами на урокиназу человека в концентрации 10 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере, pH 7,4. В качестве первых антител использовали моноклональные антитела на эпитоп урокиназы, расположенный вблизи активного центра. После трехкратной отмывки фосфатно-солевым буфером, содержащим БСА (1 мг/мл) и блокирования участков неспецифического связывания с белками следовала инкубация с образцом либо со стандартом урокиназы. В качестве стандарта использовали урокиназу человека, выделенную из мочи [16]. После пятикратной отмывки в лунки вносили

биотинилированные козы поликлональные антитела на урокиназу человека (GANUK-Biotin) в концентрации 1 мкг/мл. Далее следовала инкубация с конъюгатом стрептавидин-полипероксидаза в концентрации 1,64 мкг/мл. (Конъюгат стрептавидин-полипероксидаза был любезно предоставлен Д. Плаксиным) Инкубацию с субстратом - орто-фенилендиамином (0,1 мг/мл) - проводили до развития окраски и поглощение измеряли при длине волны 492 нм.

Определение каталитической активности урокиназы. Активность урокиназы определялась по специфичному хромогенному субстрату S2444 (pyroGlu-Gly-Arg-pNA:HCl). Урокиназа (в конечной концентрации 6 нМ) преинкубировалась с ИАП-1 в течение 30 мин. в буфере Трис-HCl (50 мМ, pH 8.8), содержащем БСА (1 мг/мл) и апротинин (200 ед/мл). Концентрация ИАП-1 была от 1,5 до 24 нМ, что обеспечивало соотношение ИАП-1:урокиназа, равное 0,25, 0,5, 1, 2 и 4. После инкубации и добавления субстрата (конечная концентрация 3,3 мМ) определяли высвобождение паранитроанилида путем измерения поглощения при длине волны 405 нм каждые 5 минут. После получения зависимости количества расщепленного субстрата от времени протекания реакции для каждой концентрации урокиназы данные обрабатывались и представлялись в виде графика зависимости тангенса угла наклона (для каждой концентрации ИАП-1) от соотношения концентраций урокиназы и ИАП-1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. После культивирования гладкомышечных клеток в течение 1-2 суток в бессывороточной среде урокиназа в культуральной среде не была обнаружена. Через 1-2 мин. после добавления факторов роста к гладкомышечным клеткам наблюдалась повышение концентрации урокиназы в среде инкубации (до 12 пМ). Далее через 5 мин. концентрация урокиназы в культуральной среде уменьшалась до значения менее 2 пМ, потом медленно увеличивалась в течение 30 мин. приблизительно до значения 6 пМ. К шестидесятой минуте после начала стимуляции клеток факторами роста концентрация снижалась до значений менее предела детекции (2 пМ). Общая картина секреции урокиназы была сходна для случаев стимуляции как PDGF BB, так и bFGF (рис. 1 А и Б) при использовании системы ИФА с моноклональными антителами к урокиназе.

В состоянии покоя гладкомышечные клетки содержали около 700 пг/10⁶ клеток. Максимальное количество секретированной в культуральную среду урокиназы составляло около 60 % от общего содержания урокиназы в клетках.

Снижение концентрации урокиназы в культуральной среде на пятой минуте после начала стимулирования клеток факторами роста не может происходить путем связывания этого с рецептором и последующего эндоцитоза, так как достоверно регистрируемый эндоцитоз в этих клетках наблюдается только спустя 15-20 мин. после взаимодействия с рецептором. Так быстро (за несколько минут) может происходить сорбция секретированной урокиназы на поверхности клеток или на межклеточном матриксе. Для проверки этого предположения к клеткам была добавлена экзогенная урокиназа человека в конечной концентрации 6 пМ. Урокиназу добавляли к клеткам одновременно с фактором роста (bFGF). При этом к пятой минуте концентрация экзогенно добавленной урокиназы в культуральной среде значительно снижалась (рис. 2). В контрольных пробах, в которых не было гладкомышечных клеток, содержание добавленной урокиназы не изменялось. На основании этих данных можно было сделать предположение, что урокиназа после секреции в культуральной среде может в течение пяти мин. связываться с внеклеточным матриксом или участками связывания на мембранах клеток и таким образом выводиться из культуральной среды. Предположение о возможности связывания урокиназы с внеклеточным матриксом также согласуется с литературными данными о наличии в

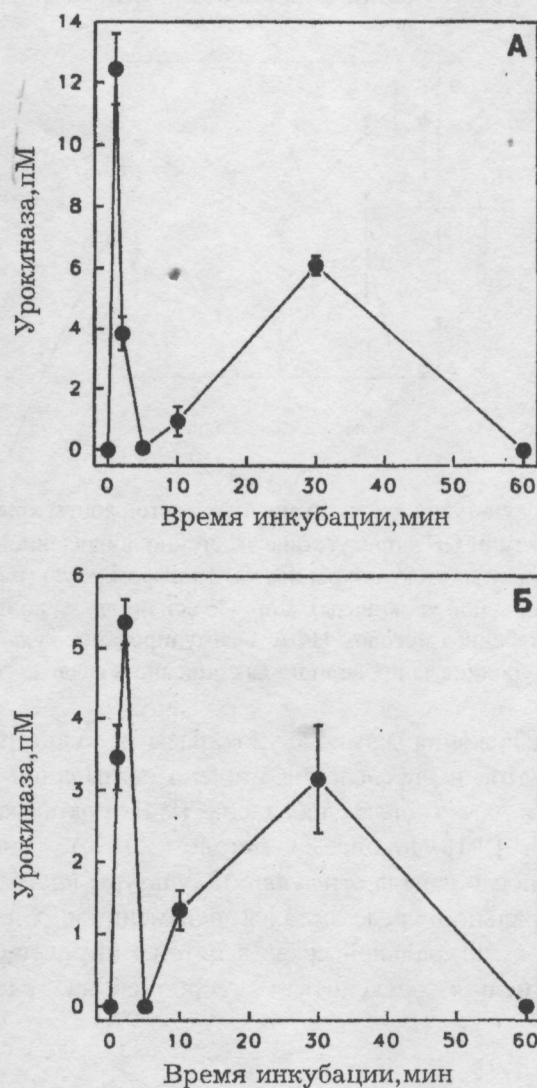


Рисунок 1.

Секреция урокиназы культурой гладкомышечных клеток аорты крысы под действием факторов роста: PDGF BB (50 нг/мл) (а), и bFGF (50 нг/мл) (б). По оси абсцисс: время стимуляции культуры клеток фактором роста, мин. По оси ординат: концентрация урокиназы в культуральной среде, пМ, измеренная методом ИФА, после вычитания базального уровня. Стимулирование культуры клеток и измерение количества секретируемой урокиназы проводили, как описано в разделе "Методы исследования".

матриксе культуры гладкомышечных клеток ингибитора урокиназы - ИАП-1, связанного с витронектином, и таким образом находящегося в активной форме, способной связываться с урокиназой [10]. Урокиназа также может связываться с фибронектином, одним из компонентов внеклеточного матрикса. С другой стороны, полученные данные можно объяснить тем, что при стимуляции факторами роста культура гладкомышечных клеток секретирует в культуральную среду кроме урокиназы фактор, который способен связываться с урокиназой и препятствовать ее детекции методом ИФА. Было показано [10], что под

влиянием PDGF культивированные гладкомышечные клетки могут синтезировать и секретировать быстро взаимодействующий с урокиназой ингибитор - ИАП-1.

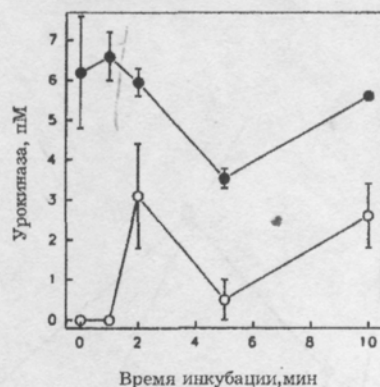


Рисунок 2.

Секреция урокиназы культурой гладкомышечных клеток аорты крысы под действием bFGF (50 нг/мл) (O-O) и под действием bFGF в присутствии экзогенно добавленной урокиназы (6 пМ) (●-●).

По оси абсцисс: время стимуляции культуры клеток фактором роста (или фактором роста в присутствии экзогенно добавленной урокиназы), мин. По оси ординат: концентрация урокиназы в культуральной среде, пМ, измеренная методом ИФА. Стимулирование культуры клеток и измерение количества секретированной урокиназы проводили, как описано в разделе "Методы исследования".

Для проверки предположения о выводе урокиназы из культуральной среды путем ее сорбции на поверхности клеток и определения мишени связывания урокиназы, к культуре клеток вместе с факторами роста была добавлена [125 I]-урокиназа (12 пМ). Измерение концентрации экзогенной [125 I]-урокиназы методом ИФА показало снижение ее концентрации через 5 мин. после начала стимуляции культуры клеток bFGF, однако уровень радиоактивности в культуральной среде остался неизменным. Следовательно, снижение концентрации урокиназы в культуральной среде к пятой минуте после начала стимуляции клеток факторами роста нельзя объяснить ее сорбцией на клеточной поверхности

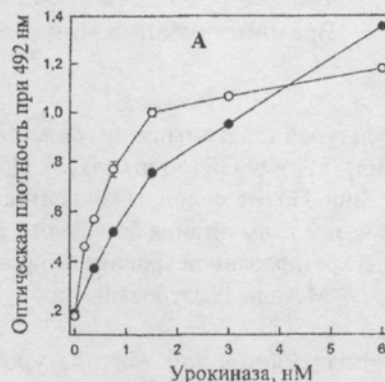


Рисунок 3 А.

Влияние ИАП-1 (12 нМ) на детекцию урокиназы используемой нами системой ИФА. По оси абсцисс: концентрация урокиназы, нМ. По оси ординат: оптическая плотность при длине волны 492 нм.

Урокиназа была раститрована в фосфатно-солевом буфере, содержащем БСА (1 мг/мл) и Tween-20 (0,01%) (O-O), а также в этом буфере с добавлением ИАП-1 в концентрации 12 нМ (●-●).

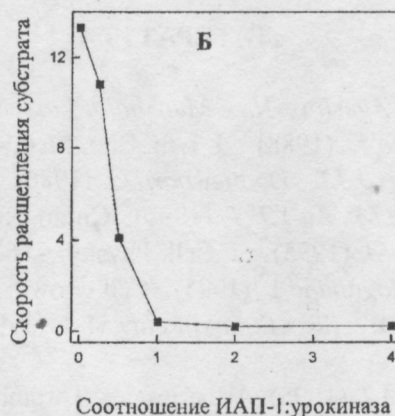


Рисунок 3 Б.

Ингибирование каталитической активности урокиназы в присутствии ИАП-1. По оси абсцисс: молярное соотношение ИАП-1:урокиназа. По оси ординат: скорость расщепления субстрата урокиназы, выраженная как тангенс угла наклона прямой количества расщепленного субстрата в зависимости от времени реакции. Урокиназы была использована в концентрации 6 нМ, концентрация ИАП-1 была 1.5, 3, 6, 12 и 24 нМ, таким образом соотношение ИАП-1:урокиназа составляло 0.25, 0.5, 1, 2, 4 соответственно.

или связыванием с белками внеклеточного матрикса. Можно предположить, что при стимуляции факторами роста культура гладкомышечных клеток секретирует фактор, возможно, ИАП-1, который образует комплекс с урокиназой и тем самым нарушает ее взаимодействие с антителами, используемыми для детекции урокиназы.

Для проверки этой гипотезы использовали препарат рекомбинантного ИАП-1 (American Diagnostica Inc.), который был способен, образуя с урокиназой эквимоларный комплекс, ингибировать ее активность (рис. 3 Б). Оказалось, что препарат ИАП-1 даже при избытке над содержанием урокиназы не оказывает значительного влияния на детекцию этого фермента используемой нами системой ИФА (рис. 3 А). Следовательно, секреция ИАП-1 не может приводить к кажущемуся снижению содержания урокиназы в культуральной среде. Снижение концентрации урокиназы в культуральной среде на 5-10 мин. (рис. 1) инкубации гладкомышечных клеток с факторами роста мы наблюдали постоянно и этот эффект был хорошо воспроизводим. В то же время, приведенные выше данные свидетельствуют, что это снижение не может быть объяснено ни эндоцитозом, ни связыванием с клетками или межклеточным матриксом. Учитывая способность урокиназы связываться с другими, помимо ИАП-1, белками (рецептором урокиназы, плазминогеном, фибронектином и др.), можно предположить, что факторы роста стимулируют секрецию из гладкомышечных клеток белка (или белков), который обладает высоким сродством к секретированной урокиназе и, связывая ее, нарушает взаимодействие с антителами. Этот белок отличен от ИАП-1, а его взаимодействие с урокиназой может быть причиной поразительно быстрого "выведения" протеазы из крови.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты №№ 96-04-50714 и 96-04-48934).

ЛИТЕРАТУРА

1. Grondal-Hansen J., Agerlin N., Munkholm-Larsen P., Bach F., Nielsen L.S., Dombernowsky P., Dano K. (1988). *J. Lab. Clin. Med.* - **111**, 42-51.
2. Binnema D.J., van Iersel J.J.L., Dooijewaard G. (1986). *Thromb. Res.* - **43**, 569-577.
3. Clowes A.W., Clowes M.M., Au Y.P.T. (1990). *Circul. Res.* - **67**, 61-67.
4. Gualandris, A., Presta, M. (1995). *J. Cell. Physiol.* - **162**, 400-409.
5. Besser D., Presta M., Nagamine Y. (1995). *Cell Growth Differ.* - **6**, 1009-1017.
6. Jackson C.L., Raines E.W., Ross R., and Reidy M.A. (1993). *Arterioscler. Thromb.* - **13**, 1218-1226.
7. Ettensohn D.S., Gotlieb A.I. (1995). *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **15**, 515-521.
8. Koyama N., Hart C.E., Clowes A.W. (1994). *Circ. Res.* **75**, 682-691.
9. Kruithof E.K.O., Tran-Thang C., Bachmann F. (1986). *Thromb. Haemost.* **55**, 201-205.
10. Reilly C.F., McFall R.C. (1991). *J. Biol. Chem.* - **266**, 9419-9427.
11. van Mourik J.A., Lawrence D.A., Loskutoff D.J. (1984). *J. Biol. Chem.* - **259**, 14914-14921.
12. Hekman C.M., Loskutoff D.J. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**, 11581-11587.
13. Levin E. (1986). *Blood* **67**, 1309-1313.
14. Sprengers E.D., Kluit C. (1987). *Blood* - **69**, 381-387.
15. Cubellis M.V., Wun T.-C., Blasi F. (1990). *EMBO J.* - **9**, 1079-1085.
16. Del Rosso M., Dini G., Fibbi G. (1985). *Cancer Res.* **45**, 630-642.

EFFECT OF GROWTH FACTORS (bFGF AND PDGF) ON UROKINASE SECRETION BY AORTA SMOOTH MUSCLE CELLS

MUKHINA S.A. *, STEPANOVA V.V. **, MATVEYEV M.YU. **, DOMOGATSKY S.P. **, TKACHUK V.A.**.

*Moscow State University, 119899, Moscow, Vorobievsky gory; **Institute of Experimental Cardiology, Cardiology Research Center, Cherepkovskaya 15, 121552, Moscow, Russia.
Tel: 007-095-414-67-12; Fax: 007-095-414-67-19;

The dependence of urokinase (uPA) secretion on basic fibroblast growth factor (bFGF) and platelet-deprived growth factor (PDGF BB) was investigated by using of cultured rat aortic smooth muscle cells (SMC). Growth factors stimulated secretion of urokinase with two-phase kinetics within 1-60 minutes. Namely, "apparent" concentration of uPA in the conditioned media rised to 12.5 nM within the first 1-2 min and 5.8 nM after 30 min of cell stimulation by growth factors, and decreased to basal level at 5 min after stimulation of the cells. The character of uPA-secretion kinetics was similar in response to both growth factors, but the level of secreted uPA was higher in case of PDGF BB. We have shown that this decrease of uPA content in conditioned media is not related to the binding of uPA to the cell surface receptors or extracellular matrix proteins. One can suppose that urokinase secreted within 5 minutes could bind to secretory protein which nature has to be identified. But it was established that this secretory protein, complexing urokinase in cultured media, is not identical to the plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1).

Key Words: urokinase, growth factors, smooth muscle cells.