

· 论 著 ·

平滑肌细胞源性趋化因子所致单核细胞迁移的钙依赖性研究*

王国平 邓仲端 李丽珠 瞿智玲

(同济医科大学病理学教研室 武汉 430030)

Calcium Dependency of Monocyte Migration Induced by Smooth Muscle Cell-derived Chemotactic Factor

WANG Guo-Ping DENG Zhong-Duan

LI Li-Zhu QU Zhi-Ling

(Department of Pathology, Tongji Medical University, Wuhan 430030)

ABSTRACT The monocyte migration induced by the media, as the source of chemotactic factor, conditioned by cultured rabbit aortic smooth muscle cells, was assayed by micropore filter method using modified Boyden chamber; the effects of extracellular Ca^{2+} at different concentrations and verapamil on the monocyte migration were observed as well. Furthermore, the influences of above-mentioned conditioned media and verapamil on monocyte cytosolic free Ca^{2+} concentration, $[\text{Ca}^{2+}]_i$, which was determined by using Fura-2 measurement, were observed. The results showed that the conditioned media were significantly chemotactic for monocytes and its chemotactic activity was inhibited by verapamil; the media also significantly increased $[\text{Ca}^{2+}]_i$ that were inhibited by verapamil as well. Extracellular Ca^{2+} had also some influences on monocyte migration. The results suggest that monocyte migration are dependent on both cytosolic free Ca^{2+} and extracellular Ca^{2+} .

KEY WORDS Migration; Monocyte; Calcium; Chemotactic factor, smooth muscle cell; Atherosclerosis

摘要 本文以培养的兔主动脉平滑肌细胞条件培养基作为趋化因子的来源,用改良的 Boyden 小室

微孔滤膜法进行单核细胞的迁移试验,并观察戊脉胺和细胞外 Ca^{2+} 对其影响。用 Fura-2 检测单核细胞胞液游离钙浓度,并观察上述条件培养基及戊脉胺对其影响。结果表明,该条件培养基对单核细胞有明显趋化作用并被戊脉胺所抑制;它也能明显地升高单核细胞胞液游离钙浓度,并被戊脉胺所抑制。细胞外 Ca^{2+} 也能影响单核细胞的迁移。以上结果提示,单核细胞迁移对细胞内、外 Ca^{2+} 均有依赖性。

关键词 迁移;单核细胞;钙;平滑肌细胞趋化因子;动脉粥样硬化

目前已公认,动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)斑块中含有巨噬细胞源性和平滑肌细胞源性两种泡沫细胞,血液单核细胞(monocyte, MC)受到多种趋化因子的作用而向内皮下间隙迁移,但其机制尚不明了,而迁移过程中对细胞内、外 Ca^{2+} 的依赖性尚未见文献报道。作者以培养的兔主动脉平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)的条件培养基作为趋化因子的来源,着重研究单核细胞迁移对细胞内、外 Ca^{2+} 的依赖性。

1 材料与方法

1.1 正常兔主动脉 SMC 的培养及条件、非条件培养基的制备

取 4~6 周龄家兔的主动脉中膜平滑肌进行培养。原代培养采用贴块法^[1],待细胞长满瓶底,用胰蛋白酶加 EDTA 消化传代。常规培养用含 10% 胎牛血清的 M199 培养基(Nissui 公司)。当第 4 代 SMC 基本上融合时,移去原培养基, PBS 清洗细胞 3 次,加入无血清培养基(DME/F-12 混合培养基, Sigma 公司),继续培养 48 小时,收集培养液,离心,上清液即为 SMC 条件培养基。非条件培养基的制备过程同上,只是培养瓶中不加入 SMC。SMC 的鉴定:倒置相差显微镜下, SMC 呈典型“峰与谷”结构;免

* 国家八五科技攻关项目

抗肌动蛋白抗体染色呈阳性反应。

1.2 兔血单核细胞的分离及鉴定

将淋巴细胞分离液 (上海试剂二厂) 100 ml 加 60% 泛影葡胺 (上海信谊药厂) 3.5 ml 用以分离兔血单个核细胞。Giemsa 和非特异性酯酶 (NSE) 染色, MC 纯度大于 80%, 台盼蓝拒染试验, 活细胞大于 90%。

1.3 迁移试验

1.3.1 MC 迁移试验 用改良的 Boyden 小室进行^[1], 下室加满各种实验液 (含或不含趋化物质), 上室加入 MC 悬液, 上下室间隔以硝酸纤维素微孔滤膜 (德国 Schleicher & Schuell 公司), 将小室置于 37℃ 5%CO₂ 培养箱中温育 90 分钟。取出滤膜, 放入染色铜网中, Harris 苏木素染色。

1.3.2 MC 移动距离的检测 在显微镜 (物镜×40, 目镜×10) 下, 调微调旋钮至焦点对准滤膜表面 (可见膜结构和大量 MC) 作为起点, 向下转动微调旋钮, 可见细胞数目逐渐减少, 至只有 2~3 个细胞为止, 即为 MC 移动的终点 (Fig 1~3)。从微调手轮的刻度上读出起点到终点的微米数, 即为 MC 移动的距离。每膜随机取 5 个视野, 每组两张膜共 10 个视野, 实验共进行 3 次, 共得 30 个数据, 算出平均数和标准误 ($\bar{x} \pm s$)。

1.3.3 不同细胞外 Ca²⁺ 浓度的调制 在非条件培养基中加入与其中 Ca²⁺ 浓度相等的 EGTA

1.051mmol·L⁻¹, 以除去其中的 Ca²⁺, 再根据实验的需要, 加入不同剂量的 CaCl₂, 配制不同 Ca²⁺ 浓度的非条件培养基^[1]。

1.3.4 SMC 条件培养基对 MC 趋化试验及戊脉胺对其影响 分 5 组: (1) 随机移动组即阴性对照组, 上下室均为非条件培养基, 以观察 MC 的随机移动; (2) 化学促动组, 上下室均为条件培养基, 以观察在上下室无趋化因子的浓度梯度时 MC 的移动; (3) 趋化运动组, 上室加入 SMC 条件培养基, 以观察其对 MC 是否有趋化活性; (4) 阳性对照组, 下室加入活化血清, 即正常兔血清经酵母提取物激活而或^[12], 其中含 C5a, 对 MC 有很强的趋化活性; (5) 戊脉胺组, 上室 MC 悬液中加入终浓度为 5×10^{-6} mol·L⁻¹ 的戊脉胺 (德国 Knoll 公司) (Tab 1)。

1.3.5 细胞外 Ca²⁺ 浓度对 MC 迁移的影响 分 7 组, 各组下室均加满 SMC 条件培养基; 上室的 MC 悬液除对照组为非条件培养基外, 其余 6 组均为重新配制 Ca²⁺ 浓度的非条件培养基, 其终浓度分别

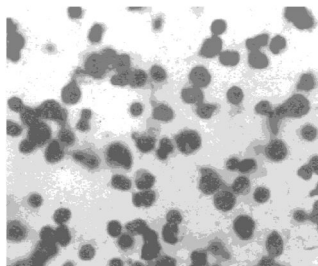


Fig 1. Monocytes on surface of the micropore filter.

Harris' hematoxylin, ×500.

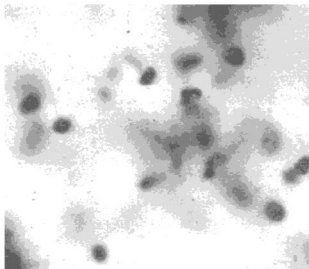


Fig 2. Monocytes at the midpoint of the whole migration distance, and cell number decreased significantly. Harris' hematoxylin, ×500.

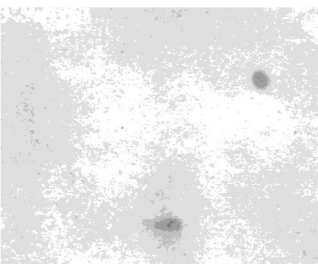


Fig 3. 2~3 monocytes at the endpoint of migration. Harris' hematoxylin, ×500.

Tab 1. Grouping in migration assay using modified Boyden chamber.

groups	liquids of MC suspension in upper chamber	experimental liquids in lower chamber
random migration	unconditioned media	unconditioned media
chemokinesis	conditioned media	conditioned media
chemotaxis	unconditioned media	conditioned media
positive control	unconditioned media	activated serum
verapamil	unconditioned media containing verapamil	conditioned media

为: 0、0.05、0.125、1.25、2.5 和 $5.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.4 MC 胞液游离钙浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 的测定^[4]

将收集的 MC 用 RPMI1640 培养基 (Gibco 公司) 制备 MC 悬液。然后加入终浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Fura2/AM (中国医学科学院药物研究所研制), pH 7.2, 细胞密度 1×10^6 个/ml。在 37°C 下温育 30 min, 并不断振摇。离心, 去上清液, 用标准盐溶液^[5]清洗细胞 2 次。最后根据实验的需要用不同条件的溶液来制备 MC 悬液, pH 7.4, 细胞密度为 1×10^6 个/ml, 细胞成活率必须大于 90%。本实验用 F-3000 型荧光分光光度计进行荧光测定。 λ_{ex} 为 $340 \pm 5 \text{ nm}$, λ_{em} 为 $500 \pm 5 \text{ nm}$ 。分别测定各种条件下的 MC 悬液的荧光值 F 、 F_{max} 、 F_{min} 和细胞自身荧光值, 一般要求低于细胞内 Fura-2 荧光值的 1%。计算公式为:

$$F_{min} = F_m + (F_{max} - F_m) / 6$$

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = Kd \frac{F - F_{min}}{F_{max} - F} \quad (\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$$

其中, Kd 为 Fura-2 与 Ca^{2+} 反应的解离常数, 其值为 $224 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.5 SMC 条件培养基、戊脉胺对 MC 的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响

实验分 5 组: (1) 用标准盐溶液制备 MC 悬液; (2) 用非条件培养基制备 MC 悬液; (3) 用条件培养基制备 MC 悬液; (4) 用条件培养基制备 MC 悬液, 并加入终浓度为 $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的戊脉胺; (5) 用非条件培养基制备 MC 悬液, 并加入终浓度为 $5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的戊脉胺。上述悬液均保存在 37°C , 45 min 后进行 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 测定。共测 4 次, 各组样本数均为 16。

2 结果

SMC 条件培养基对 MC 的迁移及戊脉

胺对其影响的结果, MC 的平均移动距离 ($\bar{x} \pm s_x, \mu\text{m}$) 分别为: 随机移动组 43.0 ± 1.3 、化学促动组 44.8 ± 1.8 、趋化运动组 67.4 ± 2.1 、阳性对照组 93.9 ± 1.6 、戊脉胺组 46.8 ± 2.6 。结果表明, 趋化运动组和阳性对照组的 MC 移动距离明显大于随机移动组和化学促动组, 其差异经统计学处理有极显著性意义 ($P < 0.01$); 随机移动组与化学促动组相比, 其 MC 移动距离的差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 戊脉胺组的 MC 移动距离明显小于趋化运动组, 差异有极显著性意义 ($P < 0.01$)。

不同细胞外 Ca^{2+} 浓度下的趋化试验, MC 的平均移动距离见 Tab 2。

Tab 2. Monocyte migration distance in liquids at various extracellular Ca^{2+} concentration.

groups	extracellular Ca^{2+} concentration ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	migration distance (μm)
control	1.051	$55.4 \pm 2.6 *$
I	0.000	$22.0 \pm 1.4 \Delta$
II	0.050	26.3 ± 1.3
III	0.125	42.1 ± 1.7
IV	1.250	$52.4 \pm 1.2 * *$
V	2.500	43.3 ± 1.6
VI	5.000	$23.6 \pm 1.0 \Delta \Delta$

* * compared with *, $P > 0.05$

* * compared with

Δ and $\Delta \Delta$, $P < 0.01$.

结果表明, 随着细胞外 Ca^{2+} 浓度逐渐升高, MC 移动的距离逐渐增大, 当外 Ca^{2+} 达到一定浓度时 (生理浓度下, $1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 其迁移的距离最大, 再继续加大细胞外 Ca^{2+} 浓度, 迁移距离逐渐减小 (Fig 4)。

MC 的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 测定结果显示, 用条件培养基制备 MC 悬液, 其 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($276.1 \pm 5.2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 明显高于非条件培养基制备的 MC 悬液的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($118.2 \pm 3.2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 差异有极显著性意义 ($P > 0.01$); 用非条件培养基制备的 MC 悬液与用标准盐溶液的 MC 悬液的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($108.5 \pm 4.5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 相比, 差异无显著性意义 ($P > 0.05$); 用条件培养基制备 MC 悬液同时使

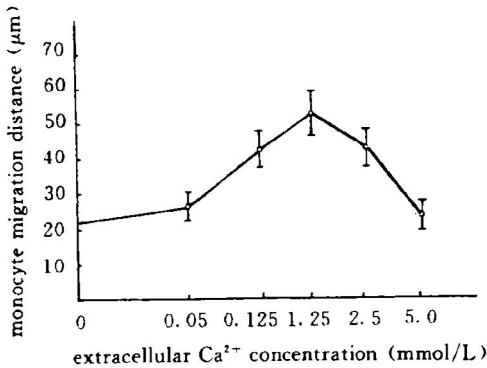


Fig 4. Effect of extracellular Ca^{2+} concentration on monocyte migration.

The migration distance was maximal at physiological concentration of $1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Ca^{2+} and decreased gradually with increase or decrease in extracellular Ca^{2+} levels.

用了戊脉胺, 其 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($124.8 \pm 3.2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 明显低于未用戊脉胺组, 差异有极显著性意义 ($P < 0.01$); 而用非条件培养基制备 MC 悬液, 使用了戊脉胺后, 其 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($110.2 \pm 2.9 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与未使用戊脉胺时相比, 差异无显著性意义 ($P > 0.05$) (Tab 3)。

Tab 3. Cytosolic free Ca^{2+} concentration of monocytes in various conditions

Groups	various MC suspension	$[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
I	standard saline	108.5 ± 4.5
II	unconditioned media	$118.2 \pm 3.2 \triangle$
III	conditioned media	$276.1 \pm 5.2 \triangle \triangle$
IV	conditioned media containing verapamil	$124.8 \pm 3.2 *$
V	unconditioned media containing verapamil	110.2 ± 2.9

$\triangle \triangle$ compared with $\triangle$, $P < 0.01$. $\triangle \triangle$ compared with $*$, $P < 0.01$.

3 讨论

目前大量的研究表明, MC 受到多种趋化因子的作用向血管壁内迁移, 乃是 As 发生的早期变化之一。因此, 探讨 MC 迁移的机制, 对于研究 As 的发生、发展有极为重要的意义。

本实验结果表明, 趋化运动组的 MC 移

动距离明显大于随机移动组, 而化学促动组的 MC 移动距离与随机移动组的差异无显著性意义。因此, SMC 条件培养基所致的 MC 迁移是一种趋化作用, 而非化学促动作用。

现已证明, 血管 SMC、中性粒细胞、淋巴细胞的迁移都明显地受 Ca^{2+} 和钙拮抗剂的影响。Marks^[6]报道, 中性粒细胞的迁移必需有其 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 快速短暂的升高。我们用 Fura-2 来测定 $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 结果表明, 导致 MC 迁移的 SMC 条件培养基能明显地升高 MC $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 并被戊脉胺所抑制。因此推测, MC 的迁移必需有 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高, 因而 MC 的迁移是一种细胞内 Ca^{2+} 依赖性过程。

细胞外 Ca^{2+} 在 MC 迁移中究竟起何作用? 本实验显示, SMC 源性趋化因子所致的 MC 迁移明显地受戊脉胺的抑制, 且对细胞外 Ca^{2+} 有依赖性 (Fig 4), 在生理浓度下, 其迁移的距离最大。细胞外 Ca^{2+} 浓度过大或过小, 都明显地抑制 MC 的迁移。在我们的实验条件下, 在缺乏细胞外 Ca^{2+} 时, MC 仍有轻微的移动。有资料表明, 细胞能动员胞内储存 Ca^{2+} 而完成 Ca^{2+} 依赖性的活动^[7]。本实验结果提示, MC 迁移对细胞内、外 Ca^{2+} 均有依赖性。

4 参考文献

- 1 邓仲端, 邱红明, 瞿智玲 et al. 巨噬细胞源性趋化因子所致的平滑肌细胞迁移. 中华病理学杂志, 1993, 22 (3): 163
- 2 朱阎宏, 王珩, 邓仲端 et al. 培养的动脉粥样硬化兔主动脉平滑肌细胞产生单核细胞趋化因子. 中国循环杂志, 1991, 6: 216~218.
- 3 NaKao J, Ito H, Ooyama T et al. Calcium dependency of aortic smooth muscle cell migration induced by 12-L-hydroxy-5,8,10,14-excosatetraenoic acid. *Atherosclerosis*, 1983, 46: 309~319.
- 4 王国平, 邓仲端. 用 Fura-2 测量单核细胞胞浆游离钙浓度的方法. 中国病理生理杂志, 1993, 9: 552
- 5 Virgilio FD, Steinberg TH, Swanson JA et al. Fura-2 secretion and sequestration in macrophages. *J Immunol*, 1988, 140: 915~920.

6 Marks PW. Transient increases in cytosolic free Calcium appear to be required for the migration of adherent human neutrophils. *J Cell Biol*, 1990, 110: 43~52.

extracellular and intracellular calcium in cytosol enzyme release and superoxide anion generation by human neutrophils. *Biochim Biophys Acta*, 1981, 67: 512~520.

7 Smolen JE, Korchak HM, Weissmann G. The roles of