

巨噬细胞集落刺激因子对小鼠腹腔 巨噬细胞抗氧化能力的影响

刘翠华^① 欧阳谦 陈 瑗 周 玫

(第一军医大学自由基医学研究室, 广州 510515)

Effect of Macrophage Colony Stimulating Factor on the Antioxidative Capacity of Murine Peritoneal Macrophages

LIU Cui-Hua, OUYANG Qian, CHEN Yuan and ZHOU Mei

(Research Laboratory of Free Radical Medicine, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT

Aim The effects of macrophage colony stimulating factor (MCSF) on the antioxidative capacity and foam cell formation of murine peritoneal macrophages were observed.

Methods MCSF was in the conditional cultural liquids of L929 cell line. Superoxide dismutase (SOD) activity was detected by Pyroayolol method, and selenium dependent glutathione peroxidase (SeGSHPx) activity was detected by DTNB method, the survival number of murine macrophages was detected by MTT method.

Results MCSF could enhance SeGSHPx and SOD activities, moreover, it could prevent foam cell formation caused by active oxygen and elevate the survival number of murine macrophages.

Conclusion The enhancement of antioxidant activities by MCSF may be one of the reasons that MCSF can prevents foam cell formation and retard the progression of atherosclerosis.

KEY WORDS Macrophage colony stimulating factor; Seleniumdependent glutathione peroxidase; Superoxide dismutase; Foam cell formation; Atheros-

clerosis

摘 要 越来越多的实验结果证实巨噬细胞集落刺激因子在动脉粥样硬化发生过程中的重要作用,为了探讨巨噬细胞集落刺激因子和活性氧与动脉粥样硬化之间的相互关系,观察了巨噬细胞集落刺激因子对培养的小鼠腹腔巨噬细胞抗氧化酶活性的影响。结果发现巨噬细胞集落刺激因子能使小鼠腹腔巨噬细胞谷胱甘肽过氧化物酶活性提高 32%,超氧化物歧化酶的活性提高 120%,并减轻叔丁基氢过氧化物促巨噬细胞源性泡沫细胞形成,以及提高巨噬细胞的生存数。此结果提示巨噬细胞集落刺激因子提高抗氧化酶活性的作用可能是其虽增加对氧化修饰低密度脂蛋白和胆固醇的摄入却能阻止泡沫细胞形成及动脉粥样硬化发生发展的原因之一。

关键词 巨噬细胞集落刺激因子; 谷胱甘肽过氧化物酶; 超氧化物歧化酶; 泡沫细胞形成; 动脉粥样硬化

大量的研究表明,活性氧在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发生发展过程中起着促进作用。活性氧引发的多不饱和脂肪酸的过氧化及其产物生成高活性的氧自由基,对巨噬细胞产生很大的毒性效应,导致巨噬细胞泡沫样变性,目前认为这是动脉粥样硬化发生早期的主要病理变化^[1]。巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony stimulating factor, MCSF)作为能特异性增强巨噬细胞功能的一种细胞因子,在动脉粥样硬化发生发展过程中所起的作用引起了人们的重视^[2,3]。本实验研究了 MCSF 对小鼠腹腔巨噬细胞抗氧化能力的影响。

国家自然科学基金资助项目(39670197)

①现在北京医学高等专科学校微生物学教研室,北京 100071

1 材料和方法

1.1 制备巨噬细胞集落刺激因子及检测活性

本实验所用的 MCSF 样品为含 MCSF 的 L929 细胞条件培养液,即 L929 细胞加入无血清 RPMI-1640 (GIBCO)培养液在 37℃ 条件下培养,7 天后收集上清液即为含 MCSF 的条件培养液。MCSF 活性按文献[4]介绍的方法进行测定:收集 NIH 小鼠股骨髓细胞,加入含 MCSF 的条件培养液,在琼脂半固体培养基中孵育 7 天后数细胞形成的克隆数,1 个克隆相当于 1 个活性单位,本实验所用的 MCSF 样品活性为 10^5 u/L。

1.2 小鼠腹腔巨噬细胞的制备和培养

雄性昆明鼠 40 只(体重 20 ± 2 g),购自本校实验动物中心,拉颈处死,腹腔注射无血清 RPMI-1640 培养液,收集腹腔液,500 r/min 离心 10 min,收集细胞,在 37℃ 5%CO₂ 培养箱中培养,2 h 后洗去未贴壁细胞,用橡皮刮子刮下细胞,离心收集细胞,活细胞百分率为 99%,以 1.5×10^5 /L 的细胞浓度加入不同培养瓶和 96 孔板。

1.3 细胞超氧化物歧化酶和硒依赖性谷胱甘肽过氧化物酶活性的检测

培养瓶细胞分为两组,实验组加入 20% L929 细胞条件培养液,对照组加等量无血清 RPMI-1640 培养液,两组在相同培养条件下共同孵育 72 h 后,刮下细胞,各取 3×10^6 细胞,加入 0.5 mL 0.1 mol/L 的磷酸钾缓冲液(pH 7.4),超声粉碎细胞,按文献[5,6]介绍的方法分别检测超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和硒依赖性谷胱甘肽过氧化物酶(selenium-dependent glutathione peroxidase, SeGSHPx)的活性。

1.4 细胞形态照相和存活数检测

96 孔板分两组,分别加入 20% L929 细胞条件培养液和对照 RPMI 培养液孵育 72 h,然后加入不同浓度的叔丁基氢过氧化物(tert butyl hydroperoxide, tbOOH),24 h 后观察细胞形态,照相,并用 MTT 法[7]检测细胞存活数。

1.5 数据处理

所有数据均为 $\bar{x} \pm s$,统计分析采用两个样本均数比较的 *t*-检验。

2 结果

2.1 巨噬细胞集落刺激因子增强小鼠腹腔巨噬细胞抗氧化酶活性

正常小鼠腹腔巨噬细胞内即有一定量的抗氧化酶活性,当 MCSF 加入后,SOD 活性提高 120% ($P < 0.01$),SeGSHPx 活性提高 32.4% ($P < 0.05$)(Table 1)。

Table 1. Effects of macrophage colony stimulating factor(MCSF) on cellular SeGSHPx [mol/(L · min)] and SOD (ku/L) activities of macrophages.

Groups	SOD	SeGSHPx
Control	53 ± 31	0.21 ± 0.05
MCSF	118 ± 20^b	0.27 ± 0.04^a

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; compared with control group ($n = 6$). Macrophages were incubated with medium containing 20% MCSF for 72 h, then cellular SeGSHPx and SOD activities were determined respectively.

2.2 巨噬细胞集落刺激因子对巨噬细胞形态的影响

正常小鼠腹腔巨噬细胞经 24 h 培养后,在显微镜下观察,多数细胞呈梭形贴壁,细胞边缘清晰,细胞内见少量吞噬颗粒(附图 A, Figure A),而在 MCSF 处理组,绝大部分细胞呈梭形,有明显伸长的伪足,细胞内亦可见少量吞噬颗粒(附图 B, Figure B)。加入 tbOOH 后,对照组细胞数明显减少,镜下可见大量破碎细胞,残存活细胞大小不一,细胞结构不清晰,内有大量吞噬颗粒(附图 C, Figure C),而预先用 MCSF 孵育的巨噬细胞,细胞内亦可见许多吞噬细胞颗粒,但细胞的结构形态基本正常,细胞数未见明显减少,仍有部分细胞呈梭形,胞壁清晰(附图 D, Figure D)。

2.3 巨噬细胞集落刺激因子对巨噬细胞存活数的影响

如表 2 (Table 2)所示,MCSF 加入培养基后,能明显增加小鼠腹腔巨噬细胞的存活数,当巨噬细胞受到 tbOOH 攻击时,对照组死亡细胞明显增多,而加入 MCSF 能在一定程度上保护巨噬细胞免受 tbOOH 攻击,细胞存活数较对照组显著增多。

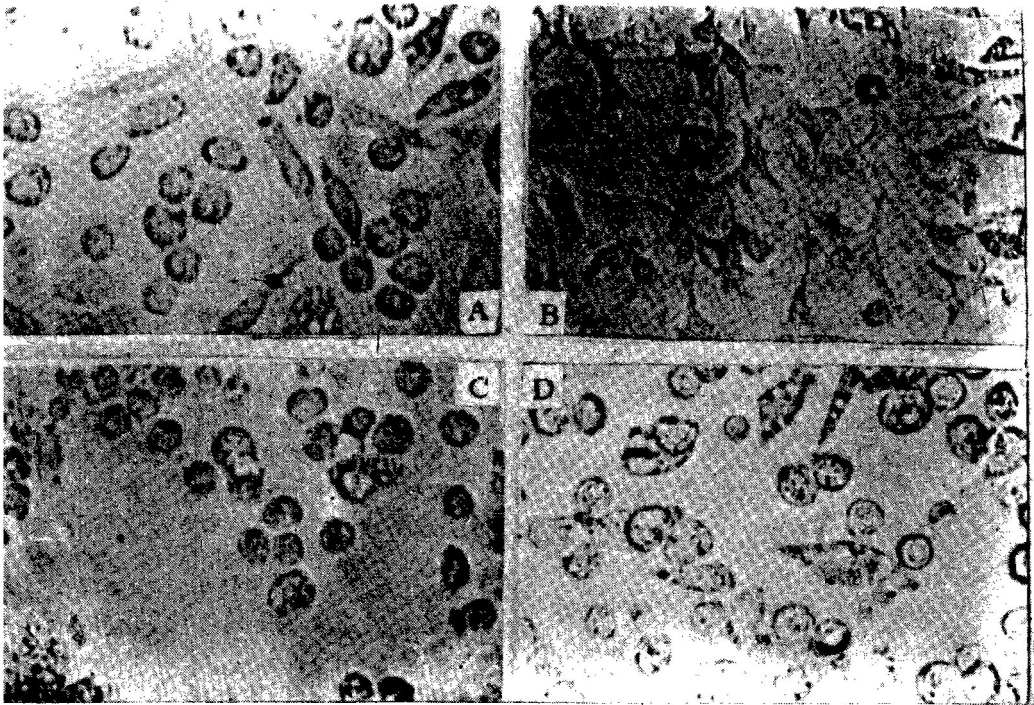


Figure. Effect of MCSF on foam-like degeneration of murine peritoneal macrophages attacked by tbOOH. A: Non MCSF treated normal macrophages (×400). B: MCSF treated normal macrophages (×400). C: Non MCSF treated macrophages attacked by tbOOH (×400). D: MCSF treated macrophages attacked by tbOOH (×400).

Table 2. Effect of the plasma of MCSF treated mice on the surviving number of mice macrophages incubated with tbOOH(mol/L) for 24 h ($\bar{x} \pm s$).

tbOOH concentration	Control group	MCSF group
0	0.480±0.081	0.581±0.056 ^a
7.5×10 ⁻⁵	0.407±0.051	0.559±0.058 ^b
1.0×10 ⁻⁴	0.301±0.060	0.491±0.057 ^b
2.5×10 ⁻⁴	0.226±0.056	0.442±0.108 ^b

Macrophages were first incubated with MCSF for 72 h, then incubated with tbOOH for 24 h, the survival numbers were measured by MTT method, alues represent the means of 570 nm absorbence of 6 experiments. a: $P<0.05$, b: $P<0.01$; compared with control group, $n=6$.

3. 讨论

巨噬细胞集落刺激因子(MCSF)作为能特异性调节 As 斑块处的主要细胞—巨噬细胞活性的细胞因子,在 As 形成中所起的作用受到

越来越多的学者们的关注。但是,对 MCSF 究竟是促进还是抑制 As 的发展,目前还有争论。一方面,研究发现 MCSF 可以降低血浆胆固醇水平,促进巨噬细胞对摄入的胆固醇的降解,促进胆固醇的逆向转运等,这就降低了 As 发病的危险因素。动物实验证实 MCSF 能减轻家族性高胆固醇血症(WHHL)家兔泡沫细胞形成,延缓动脉粥样硬化进程,减少主动脉粥样硬化斑块面积^[2]。有人甚至将 MCSF 誉为九十年代抗 As 很有希望的新药之一^[8]。但是,另一方面,MCSF 亦能增强清道夫受体表达^[9],使得摄入氧化修饰低密度脂蛋白增加,朱宇等^[10]的研究也表明 MCSF 下能造成细胞内胆固醇酯的蓄积,巨噬细胞氧化修饰低密度脂蛋白能力增高,这些因素可能加重 As 的进程。我们推测可能存在某一机制将这一矛盾协调起来。本实验发现 MCSF 能使巨噬细胞 SeGSHPx 和 SOD

两种抗氧化酶活性增强,我们知道这两种抗氧化酶在清除细胞内有害产物、清除自由基、抑制自由基反应、切断脂质过氧化链反应、尤其对防止膜脂质过氧化方面起着重要作用。因此, MCSF 可能在增加对氧化修饰低密度脂蛋白摄入的同时,也提高了细胞内抗氧化酶的活性,从而增强对氧化型 LDL 的降解。从总体效果来看还是减轻了活性氧对巨噬细胞的损伤,这与本实验中观察到的 MCSF 能使巨噬细胞受到活性氧攻击后损伤程度减轻,细胞存活数增加,泡沫细胞形成减缓的结果是一致的。

参考文献

- 1 Chen Yuan, Zhou Mei, Li Jun, et al. Injurious effect of reactive oxygen species on macrophage and its prevention by PSK. *J Clin Lab Immunol*, 1994, **43**: 99~115.
- 2 欧阳谦, 陈 媛, 周 玫. 巨噬细胞集落刺激因子、氧化修饰低密度脂蛋白与动脉粥样硬化. 生命的化学, 1996, **6** (5): 38~39.
- 3 欧阳谦, 周 玫. 巨噬细胞集落刺激因子在动脉粥样硬化发生中的作用. 国外医学—老年医学分册, 1996, **17**(5): 225~228.
- 4 Ladner MB, Martin GA, Noble JA, et al. Cdna cloning and expression of murine macrophage colony-stimulating factor from L929 cell. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**: 6 706~710.
- 5 Jenkinson SG, Lawrence RA, Burk RF, et al. Effects of copper deficiency on the activity of the selenoenzyme glutathione peroxidase and on excretion and tissue retention of $^{75}\text{SeO}_3$. *J Nutr*, 1982, **112**: 197~204.
- 6 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌, 等. 一种 SOD 的测活方法—邻苯三酚自氧化法改进. 生物化学与生物物理进展, 1996, **4**: 71~73.
- 7 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*, 1983, **65**: 55~63.
- 8 吴葆杰. 抗动脉粥样硬化药的近况和展望. 中国动脉硬化杂志, 1995, **3** (2): 140~142.
- 9 de-Villiers WJ, Fraser IP, Hughes DA, et al. Macrophage colony stimulating factor selectively enhances macrophage scavenger receptor expression and function. *J Exp Med*, 1996, **180** (2): 705~709.
- 10 朱 宇, 蔡海江, 范乐明, 等. Mm-LDL 与 M-CSF 对动脉壁细胞胆固醇酯蓄积的协同作用. 中国动脉硬化杂志, 1993, **1** (1): 40~45.

(1997-07-21 收到, 1998-01-24 修回)