

血小板源生长因子 BB 二聚体 对单核细胞粘附血管内皮的影响

王忠彪 李勇 康静^① 戴瑞鸿 范维琥

(上海医科大学附属华山医院心脏科, 上海 200040)

The Effect of Platelet-derived Growth Factor-BB on the Monocyte Adhesion to Vascular Endothelium in Vitro

WANG Zhong-Biao, LI Yong, KANG Jing, DAI Rui-Hong and FAN Wei-Hu

(Department of Cardiology, Huashan Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai 200040, China)

ABSTRACT

Aim To investigate if platelet-derived growth factor (PDGF-BB) is a chemoattractant factor for monocytes adhering vascular endothelium.

Methods Pretreated with or without inflammatory mediators (tumor necrosis factor, 50 $\mu\text{g/L}$; lipopolysaccharide 100 $\mu\text{g/L}$), the ^{51}Cr -labeled monocyte adhesion to endothelial cell (EC) monolayer was assayed.

Results PDGF-BB (1, 10, 100 $\mu\text{g/L}$) do not exert a direct influence on the monocyte adhesion to EC monolayer, but it can potentiate the augmented effect of inflammatory mediators (tumor necrosis factor, 50 $\mu\text{g/L}$; lipopolysaccharide, 100 $\mu\text{g/L}$) on the monocyte adhesion.

Conclusion PDGF-BB is by itself not a chemoattractant factor for MC, but can synergize the action of some monocyte active factors on monocyte adhesion to the vascular endothelium.

KEY WORDS Platelet-derived growth factor; Endothelial cell; Monocyte

摘要 为探讨曾被认为是单核细胞趋化物的血小板

源生长因子 BB 二聚体是否可促进单核细胞粘附血管内皮,用单层血管内皮细胞作为血管内皮模型,进行经或未经致炎因子(100 $\mu\text{g/L}$ 脂多糖和 50 $\mu\text{g/L}$ 肿瘤坏死因子)预处理的单核细胞粘附试验。结果发现,致炎因子可明显促进单核细胞粘附于单层内皮细胞。1、10 和 100 $\mu\text{g/L}$ 的血小板源生长因子 BB 二聚体对单核细胞粘附血管内皮均无直接影响。但 10 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ 的血小板源生长因子 BB 二聚体可明显增强致炎因子对单核细胞粘附单层血管内皮细胞的促进作用。此实验结果提示,血小板源生长因子 BB 二聚体本身不是单核细胞趋化物,但可与某些单核细胞活化因子协同作用,促进单核细胞粘附于血管内皮。

关键词 血小板源生长因子; 内皮细胞; 单核细胞

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)病灶中的泡沫细胞主要来源于外周血单核细胞(monocyte, MC)和血管平滑肌细胞,外周血 MC 通过粘附和浸润局部血管内皮进而摄取脂蛋白是单核细胞源性泡沫细胞形成的重要过程。了解 MC 粘附和浸润内皮的影响因素无疑可加深我们对 As 病理生理学机制的认识。较早曾有研究认为与 As、血管再狭窄发生密切相关的血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是单核巨噬细胞的有力趋化物^[1],虽未获进一步支持,但已被归纳为 PDGF 的主要生物学功能之一。PDGF 究竟是否能促进单核细胞粘附于血管内皮,本文用单层血管内皮细胞作模型,对这个问题作了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

重组人 PDGF-BB 购于 CALBIOCHEM 公司;重组人肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF- α)和脂

① 上海市中医医院内科, 200090

多糖(lipopolysaccharide, 源于 E. coli 0127:B8)为 Sigma 公司产品; $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 购自中国原子能研究所。

1.2 鼠尾胶原的制备

按文献[3]介绍的方法制备鼠尾胶原。

1.3 人脐静脉内皮细胞的培养

人脐静脉内皮细胞(以下简称内皮细胞, endothelial cell, EC)的分离培养参考文献[4]介绍的方法进行。EC 经 VIII 因子相关抗原间接免疫荧光法鉴定, 未见阴性缺损区。实验用第 2~4 代细胞。

1.4 外周血单核细胞的制备与标记

以 Ficoll 密度梯度离心法^[5]分离健康供血者的外周血单个核白细胞, 用含 1 mmol/L EDTA 和 0.5 mmol/L 乳酸钠的 RPMI 1640 洗涤, 再用贴壁纯化法^[6]制备单核细胞(MC)。分别用台盼蓝拒染法和非特异性酯酶染色测得活细胞百分率和纯度均大于 95%。

参照文献[6], 以 ^{51}Cr 标记所制备的 MC。MC 被标记后, 用培养基洗 3 次, 在 2 h 内进行实验。

1.5 单核细胞粘附于血管内皮细胞

用 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)-RPMI 1640 将消化后的 EC 调至 $2 \times 10^5/\text{L}$, 传入预衬鼠尾胶原的 96 孔板(100 $\mu\text{L}/\text{孔}$)。待长至单层时, 根据分组需要, 将经或未经 $\text{TNF-}\alpha$ (50 $\mu\text{g}/\text{L}$)、脂多糖(100 $\mu\text{g}/\text{L}$)预处理 10 min 的 MC(预处理后用培养液洗涤 3 次), 传入 96 孔板(每孔 0.1 mL 含 10^5 个细胞), 孵育 30 min(时间由预实验决定, 孵育时培养基含或不含 PDGF-BB 1, 10 和 100 $\mu\text{g}/\text{L}$)。然后洗去未粘附细胞, 加入 Triton X-100 (0.15 mL/孔)后, 用液体闪烁计数器计数放射性活数。实验共设 11 组, 每组成 3 个复孔, 重复 3 次。

1.6 统计学处理

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用两样本均数的 t 检验。

2 结果

2.1 单核细胞与单层内皮细胞的粘附

为了观察 MC 与单层 EC 粘附的时效关系, 把以 RPMI 1640 制备的 MC 悬液加至单层 EC 上, 孵育一定时间后, 通过液体闪烁计数器对粘附结果定量, 结果见图 1(Figure 1)。孵育 30 min 时, MC 的粘附结果已近峰值, 与 60、90 min 孵育结果无明显差异, 因此后续的粘附实验均采用 30 min 的孵育期。

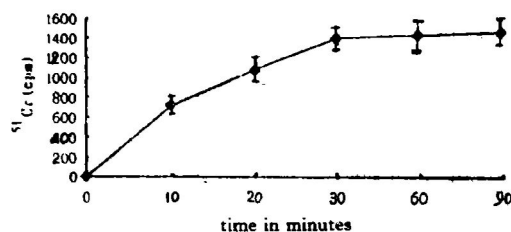


Figure 1. The control time course ^{51}Cr -labeled monocytes adhesion to RPMI 1640-incubated endothelial cells *in vitro*.

2.2 血小板源生长因子和致炎因子对单核细胞粘附单层内皮细胞的影响

如图 2(Figure 2)所示, 含不同浓度(1、10 和 100 $\mu\text{g}/\text{L}$) PDGF-BB 的培养基中单核细胞与单层内皮细胞的粘附结果较单纯培养基组无明显差异。而脂多糖和 $\text{TNF-}\alpha$ 则显示出较强的促进单核细胞与单层内皮细胞粘附的作用($P < 0.01$)。

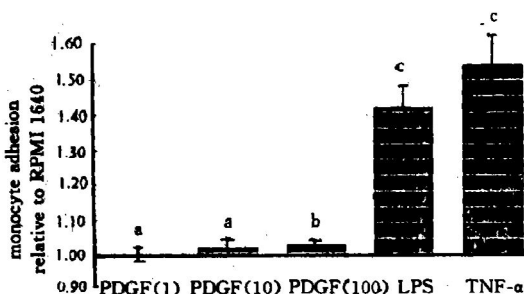


Figure 2. The effect of PDGF-BB, $\text{TNF-}\alpha$, and LPS on monocytes adhesion to monolayer endothelial cells.

The results are expressed as the ratio of adherent counts per minute relative to RPMI 1640 control. a: $P > 0.05$, b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$; compared with RPMI 1640 group.

2.3 血小板源生长因子对致炎因子促进单核细胞粘附单层内皮细胞的影响

将单核细胞用 $\text{TNF-}\alpha$ 和脂多糖预处理后与单层内皮细胞进行粘附试验, 试验时加入不同浓度的 PDGF-BB(1、10 和 100 $\mu\text{g}/\text{L}$)后发现, 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 两组的单核细胞与单层内皮细胞的粘附效应较单用 $\text{TNF-}\alpha$ 和脂多糖明显增强(图 3, Figure 3), 差异有极显著意义。

义($P < 0.05$),而 $1 \mu\text{g/L}$ 的 PDGF-BB 没有这种加强作用。

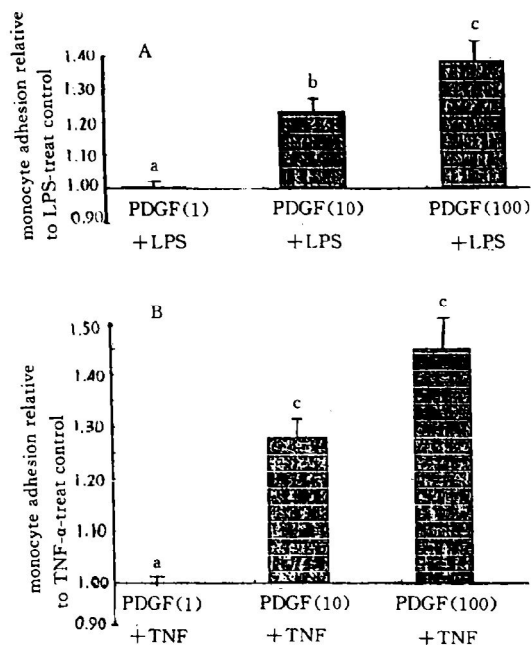


Figure 3. The effects of PDGF-BB on monocytes in presence of pretreatment with TNF- α or LPS adhesion to monolayer endothelial cells. The results are expressed as the ratio of adherent counts per minute relative to LPS-treated(A), or to TNF- α treated(B) control. b; $P < 0.05$, c; $P < 0.01$, compared with control group.

3 讨论

血小板源生长因子(PDGF)分子是由两条肽链(A和B)构成,有三种二聚体(-AA、-BB和-AB)。研究结果提示,PDGF-BB与As发生的关系密切,认为是MC的趋化物^[1]。由此推测,PDGF-BB可促进MC粘附于血管内皮。我们的实验结果说明,单一的同源二聚体PDGF-BB分子不能直接促进MC粘附于单层EC,此结果与Williams等^[1]报道的结果相悖。

在进行此项实验时,我们对主要材料和试剂进行了限定。具体措施有:①抽取健康供血者的外周血以尽可能减少所制备的细胞混有活化成份;②通过贴壁纯化获取纯度较高的MC可非笼统的单个核白细胞;③用EDTA和乳酸钠

处理混杂的血小板;④以单一的同源二聚体PDGF-BB分子进行研究而非三种形式二聚体分子的混和物。因此,实验结果是可信的。

由于炎性活化的因素可能促进MC与EC的粘附,本工作在以致炎因子TNF- α 和脂多糖(细菌内毒素)分别预处理MC后,MC的粘附率明显增高,这可能与这些致炎物上调MC表面粘附分子的表达^[8]有关。同时提示若用制备不当、混有活性成分的MC进行粘附实验,可能影响对实验结果的分析。

是否PDGF-BB在发生As的单核细胞源性泡沫细胞形成过程中就不起作用呢?体内As的发生机制是复杂的,是多因素参与的过程,其中炎性损害也是公认机制。本工作进一步的实验发现:在致炎物TNF- α 和脂多糖预处理后,PDGF-BB则可明显促进MC与EC的粘附,这可能是因为PDGF-BB作用后所引起的细胞膜花生四烯酸、磷脂酰肌醇代谢改变优化了MC粘附的条件^[7]。

本实验结果提示PDGF-BB没有直接促进MC粘附内皮的作用,其本身不是单核细胞的趋化物,但在MC粘附内皮方面可与MC的某些活化因子协同作用。此体外实验观察提示,PDGF-BB可能也参与了体内As发生中单核细胞源性泡沫细胞的形成过程。

参考文献

- Williams LT, Antoniadou HN, Goetzl EJ, et al. Platelet-derived growth factor stimulates mouse 3T3 cell mitogenesis and leukocyte chemotaxis through different structural determinants. *Clin Invest*, 1983, **72**: 1759~763.
- 鄂征. 组织培养技术. 第2版, 北京: 人民卫生出版社, 1988; 63~64.
- Maciag T. Serial propagation of human endothelial cell in vitro. *J Cell Biol*, 1989, **91**: 420.
- Boym A. Isolation of mononuclear and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest*, 1968, **97**(Suppl 21): 77~89.
- 王国平, 邓仲端, 李丽珠, 等. 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. *中国动脉硬化杂志*, 1994, **2** (1): 1~5.

-
- 6 Gallin J, Clark RC. Granulocyte chemotaxis, an improved in vitro assay employing ^{51}Cr -labeled granulocytes. *J Immunol*, 1973, **110**: 233~.240
- 7 Renkonen R, Mattila P, Turunen J, et al. Lymphocyte binding to and penetration through vascular endothelium is stimulated by platelet activating factor. *Scand J Immunol*, 1989, **30**: 673.
- (1997-10-11 收到)