

# 脂质过氧化对培养的内皮细胞表达细胞粘附分子的影响

尹鸿操 陈铁镇 董玉兰 杨向红 洪伟

(中国医科大学基础医学院实验病理学研究室, 沈阳 110001)

## Effect of Lipid Peroxidation on the Expression of Cellular Adhesion Molecules in Cultured Endothelial Cells

YIN Hong-Cao, CHEN Tie-Zhen, DONG Yu-Lan, YANG Xiang-Hong and HONG Wei

(Experimental Pathology Research Laboratory China Medical University, Shenyang 110001, China)

### ABSTRACT

**Aim** To explore whether lipid peroxidation (LPx) is capable of inducing the expression of cellular adhesion molecules (CAMs) to increase monocyte (MC) adhesion to endothelial cells (EC).

**Methods** LPx in EC was initiated with diamide (DM), the content of lipid peroxide (LPO) in EC and MC adherence were measured. After the EC was stained with immunofluorescence, the expression of vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) and endothelial leukocyte adhesion molecule (ELAM-1) was studied under laser confocal microscopy.

**Results** After LPO content in EC increased, EC expressed VCAM-1 and ELAM-1. The expression of VCAM-1 and ELAM-1 was upregulated in a time-dependent way (1, 2, 4 and 8 h) and correlated with a significant increase of MC adherence to EC.

**Conclusion** LPx could induce the expression of CAMs in EC to enhance adherence of MC to EC and migration of MC into subendothelial space which is crucial for initiation and development of atherosclerotic lesions.

**KEY WORDS** Endothelial cell; Cellular adhesion molecules; Monocyte; Lipid peroxidation

**摘要** 为观察脂质过氧化损伤对细胞粘附分子表达

的影响,用联胺诱发培养的人血管内皮细胞脂质过氧化后,检测其丙二醛含量及单核细胞粘附率,并用激光共聚焦显微镜观察细胞粘附分子表达的情况。结果发现,实验组较对照组内皮细胞丙二醛含量升高,单核细胞粘附率显著增加( $P < 0.01$ ),内皮细胞上有血管细胞粘附分子-1及内皮细胞白细胞粘附分子-1的表达,且其表达量均随时间增多。提示内皮细胞粘附分子的表达增加可能是脂质过氧化损伤导致单核细胞粘附增多的重要机制。

**关键词** 内皮细胞; 细胞粘附分子; 单核细胞; 脂质过氧化

单核细胞(monocyte, MC)在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生及发展过程中起重要作用。我们研究发现,以联胺(diamide)诱发培养的人脐静脉内皮细胞(endothelial cell, EC)脂质过氧化(lipid peroxidation, LPx),可增加MC与EC的粘附并向内皮下缝隙迁入<sup>[1]</sup>,推测在这一过程中细胞粘附分子的表达可能增加。本实验观察了脂质过氧化对EC表达血管细胞粘附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)及内皮白细胞粘附分子-1(endothelial-leukocyte adhesion molecule-1, ELAM-1)的影响以探讨LPx增加MC与EC粘附的机理。

## 1 材料和方法

### 1.1 单核细胞的分离及鉴定

以梯度离心法分离新鲜人静脉血中MC,以非特异性酯酶染色及台盼蓝拒染实验确定细胞悬液中MC纯度大于80%,存活率大于90%,调整细胞浓度至 $1 \times 10^5$ 个/mL。

### 1.2 人脐静脉内皮细胞的培养

以本研究室改进的Jaffe法<sup>[2]</sup>分离脐静脉内皮细

胞。用含 20% 人血清的 RPMI-1640 培养液(GIBCO)将细胞培养在 24 孔培养板内(Falcon)。免疫荧光显示培养的内皮细胞表达第Ⅷ因子相关抗原,电镜检查,细胞浆内有 Weibel-Palad 小体。

1.3 实验分组

将培养至融合状态的 EC 分为对照组、实验 I 组及实验 II 组。对照组加正常培养液,实验 I 组加联胺浓度为  $0.1 \times 10^{-4}$  mol/L 的培养液,实验 II 组加联胺浓度为  $0.01 \times 10^{-4}$  mol/L 的培养液,培养 60 min,进行以下实验。

1.4 过氧化脂质含量测定

取对照组、实验 I 组及实验 II 组 EC 各 4 孔,用八木 TBA 法测定 EC 中脂过氧化物(lipid peroxide, LPO)代谢终产物丙二醛(malondialdehyde)含量,以 nmol/孔表示。

1.5 单核细胞粘附率测定

取对照组、实验 I 组及实验 II 组 EC 各 16 孔。弃掉原培养液,用 37℃ 磷酸盐缓冲液轻轻冲洗 3 次,加入正常培养液继续培养,分别在 1、2、4 及 8 h 检测 MC 粘附率。方法如下:取各组 EC 各 4 孔,加入 MC 悬液(密度为  $1 \times 10^9$  个/L) 0.1 mL,孵育 30 min。用培养液轻轻吹打 EC 表面,使未粘附的 MC 悬浮,吸出培养液,计数未粘附的 MC 数量,根据加入 MC 总量计算出 MC 粘附率。

1.6 血管细胞粘附分子-1 及内皮白细胞粘附分子-1 表达的检测

取对照组、实验 I 组及实验 II 组 EC 各 16 孔。弃掉原培养液,加入正常培养液继续培养,分别在第 1、2、4 及 8 h 检测 VCAM-1 及 ELAM-1 的表达情况。方法如下:取各组 EC 各 4 孔,用甲醇固定,以磷酸盐缓冲液漂洗后,分别加入兔抗人 VCAM-1 或 ELAM-1 单克隆抗体(日本工スモパ イ 才株式会社产品,1:30 稀释),4℃ 过夜。再用缓冲液漂洗后加入荧光标记羊抗兔抗体(军事医学科学院产品,1:10 稀释),室温孵育 10 min,以缓冲液漂洗后用激光共聚焦显微镜(BIO-RAD MRC-600)检测各组阳性反应细胞的平均荧光强度,以像素值(pixelintensity)表示。

另设阳性对照组,用含 TNF(500 ku/L,军事医学科学院出品)培养液作用 EC 2 h,以后处理方法同前。

2 结果

2.1 两组丙二醛含量变化

附表(Table)显示,实验组丙二醛含量较对

照组均有所升高,其中实验 I 组较对照组差异显著( $P < 0.01$ ),说明 EC 发生了脂质过氧化。

Table. Malondialdehyde (MDA) content in EC ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ ).

Groups	Dose (mol/L)	MDA (nmol/well)
Control	0	1.331±0.072
Diamide I	$0.1 \times 10^{-4}$	2.379±0.051 <sup>a</sup>
Diamide II	$0.01 \times 10^{-4}$	1.452±0.143

a:  $P < 0.01$ , compared with control group.

2.2 单核细胞粘附率测定结果

从图 1(Figure 1)可见,实验 I 组 MC 粘附率在各时间较对照组均显著增高( $P < 0.01$ ),实验 II 组在 2、4 及 8 h 较对照组显著增加( $P < 0.01$ )。

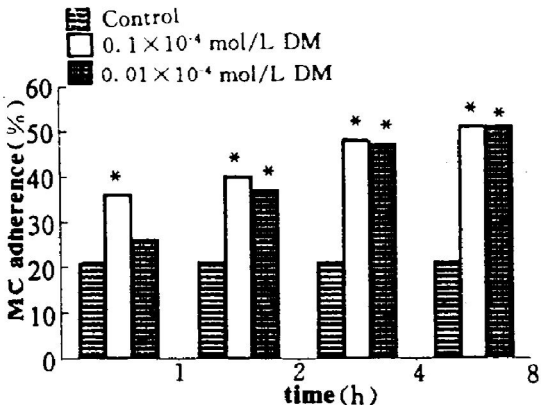


Figure 1. When EC monolayers were incubated in medium with diamide, the MC adherence to EC increased. \* :  $P < 0.01$ , compared with control group.

2.3 血管细胞粘附分子-1 及内皮白细胞粘附分子-1 的表达

2.3.1 血管细胞粘附分子-1 在内皮细胞上的表达 对照组呈阴性反应。实验组及阳性对照组呈阳性反应,在 EC 上有很强的荧光(图 2A, Figure 2A)。经检测及统计分析,实验组 EC 的平均荧光强度在各时间均高于阳性对照组( $P < 0.01$ ),且逐渐增大,在第 8 h 达最大值。实验 I 组与实验 II 组之间无显著差异(图 3, Figure 3)。

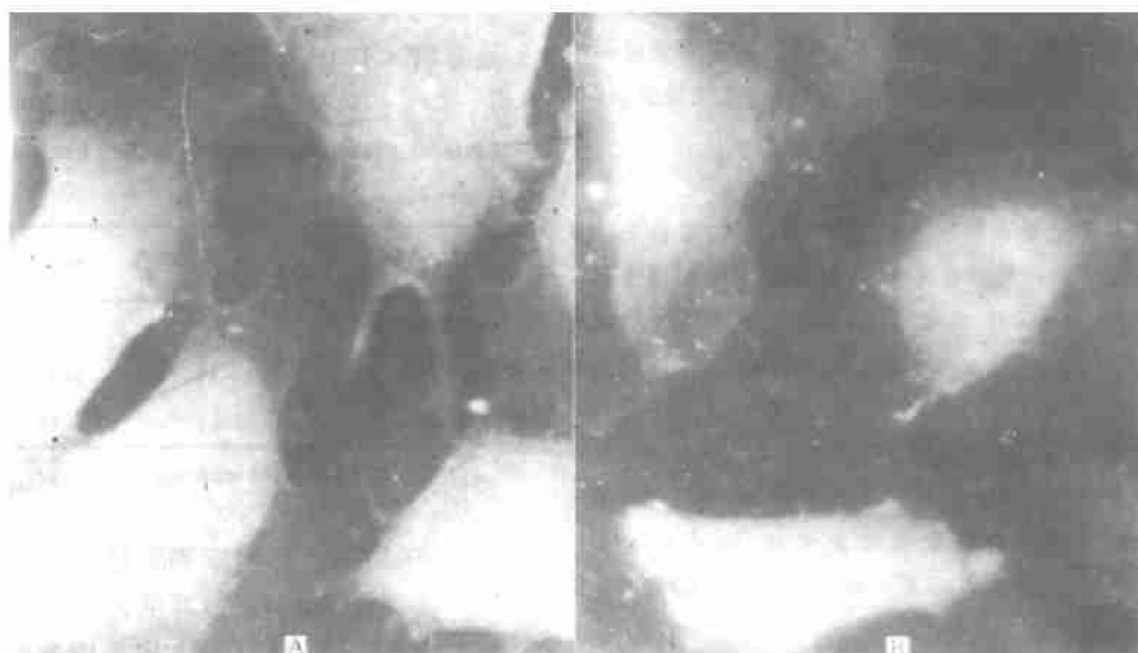


Figure 2. Immunofluorescence staining with anti-VCAM-1 antibody (A) and anti-ELAM-1 antibody (B). EC show positive staining, the cultured EC was treated with diamide in medium ( $0.01 \times 10^{-4}$  mol/L) for 1 h and cultured in normal medium for 8 h, then the EC was stained as described in methods ( $400\times$ ).

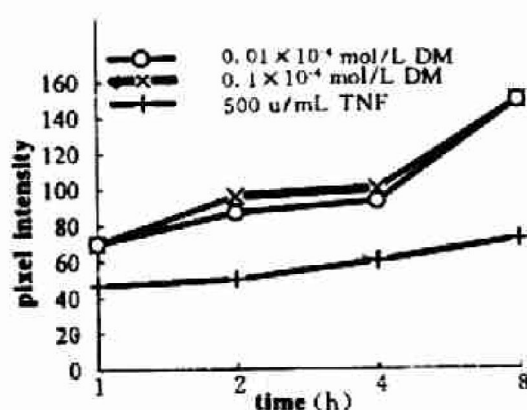


Figure 3. Time course of the expression of VCAM-1 in EC. a,  $P < 0.01$ , compared with TNF group.

2.3.2 内皮细胞粘附分子-1 在内皮细胞上的表达 对照组呈阴性反应。实验组及阳性对照组呈阳性反应,可见 EC 上有很强的荧光(图 2B, Figure 2B),经检测及统计分析,实验组的平均荧光强度在各时间均高于阳性对照组( $P < 0.01$ ),两个实验组之间比较,在第 1 h 实验 I 组高于实验 II 组( $P < 0.01$ )(图 4, Figure 4)。

### 3 讨论

血管细胞粘附分子-1 及内皮白细胞粘附分

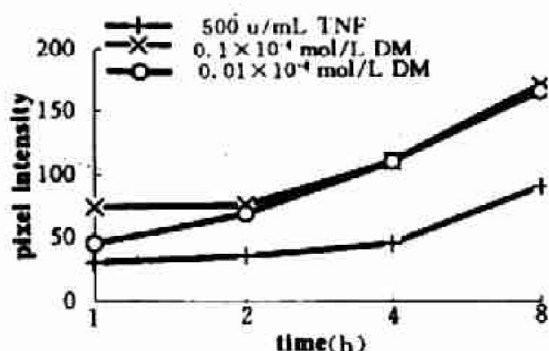


Figure 4. Time courses of the expression of ELAM-1 in EC. a,  $P < 0.01$ , compared with TNF group.

子-1 是分别属于免疫球蛋白超家族和选择素家族的细胞粘附分子。VCAM-1 的受体是极晚期相关抗原-4 (very late antigen-4, VLA-4), ELAM-1 的受体是唾液酸化的路易斯寡糖 (sialyl-Le<sup>x</sup>, Sle<sup>x</sup>)<sup>[3,4]</sup>。VLA-4 和 Sle<sup>x</sup> 都分布在 MC 上,研究表明,VCAM-1 和 ELAM-1 在介导 MC 与 EC 粘附及向 EC 下迁入过程中起重要作用。在正常情况下 EC 不表达这两种细胞粘附分子,当 EC 受细胞因子、内毒素及脂类等刺激因素作用后才表达这两种细胞粘附分子,在这两种细胞粘附分子的介导下,MC 粘附于 EC 并向 EC 下迁入<sup>[5,6]</sup>。Cybulsky 等<sup>[7]</sup>首先通过动物实验发现 As 病变早期位于泡沫细胞上方的

EC 上有细胞因子表达。O'Brien 等<sup>[8]</sup>发现人 As 斑块内巨噬细胞、平滑肌细胞及新生血管的 EC 上有 VCAM-1 表达。Poston 等<sup>[9]</sup>发现 As 病变部位的 EC 上有细胞间粘附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 表达。研究者认为这些细胞粘附分子在介导 MC 与 EC 粘附并迁入病灶过程中起重要作用,但在 As 发生过程中有哪些因素影响 EC 表达细胞粘附分子等问题尚不清楚。

洪伟等<sup>[1]</sup>报道,用联胺诱发培养内皮细胞脂质过氧化可增加 MC 与 EC 粘附及向 EC 下迁入,并推测其涉及细胞粘附分子的作用。本实验观察到以联胺作用于 EC,并检测到 EC 的脂质过氧化物含量升高后,MC 粘附率显著增加,EC 表达 VCAM-1 及 ELAM-1。在 8 h 内 VCAM-1 及 ELAM-1 表达量逐渐增大而且与 MC 粘附率的增大相一致,提示脂质过氧化通过诱导 EC 表达细胞粘附分子而增加 MC 粘附并向 EC 下迁入。当联胺浓度是  $0.01 \times 10^{-4}$  mol/L 时,尽管 EC 脂质过氧化物含量较对照组无显著性差异,但 EC 上有 VCAM-1 及 ELAM-1 表达。而在第 2、4 及 8 h MC 粘附率显著升高,推测可能与八木法的敏感度相关,由于八木法只反映丙二醛含量,可能有其他的脂质过氧化物产生会诱导 EC 表达细胞粘附分子。血管细胞粘附分子-1 不仅能介导 MC 与 EC 粘附,还能介导 T 淋巴细胞与 EC 粘附<sup>[10]</sup>。文献<sup>[11,12]</sup>报道在 As 病灶内有激活的 T 淋巴细胞,T 淋巴细胞和 MC 分泌多种细胞因子对 As 病变的发展有重要作用。

综上所述,在 As 发病过程中,脂质过氧化物会诱导 EC 表达细胞粘附分子,使大量 MC 及 T 淋巴细胞粘附并迁移到内皮下促进病灶不断扩大,深入研究脂质过氧化物影响 EC 表达细胞粘附分子的机理对阐明 As 及其它病理过程有重要意义。

## 参考文献

- 1 洪伟,陈铁镇. 内皮细胞脂质过氧化损伤对单核细胞粘附与内皮下穿入的影响. 中华医学杂志, 1994, 74(4): 228~230.
- 2 张宝庚,陈铁镇,张晶范,等. 人脐带静脉及大鼠主动脉内皮细胞的培养. 中华心血管病杂志, 1985, 13(1): 52~54.
- 3 Vonderheide RH, Sprieger TA. Lymphocyte adhesion through very late antigen  $\alpha 4$ : evidence for a novel binding site in the alternatively spliced domain of vascular cell adhesion molecule 1 and an additional  $\alpha 4$  integrin counter-receptor on stimulated endothelium. *J Exp Med*, 1992, 185: 1433~442.
- 4 Phillips ML, Edward N, Federico CA, et al. ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, Sialyl-Lex<sup>x</sup>. *Science*, 1990, 250: 1130~132.
- 5 Carols T, Kovach N, Schuartz B, et al. Human monocyte bind to two cytokine-induced adhesion ligands on cultured human endothelial cells: Endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1. *Blood*, 1991, 77: 2262~271.
- 6 Tilburg HBAJ, Blokland I, Van Furth R. Characterization of the adherence of human monocytes to cytokine-stimulated human macrovascular endothelial cells. *Immunology*, 1991, 74: 661~669.
- 7 Cybulsky MI, Ginbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*, 1991, 251: 788~791.
- 8 O'Brien KD, Allen MD, Monald TO, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 1993, 92: 945~951.
- 9 Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol*, 1992, 140: 665~673.
- 10 Nancy O, Davis LR, Bogue DT, et al. Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes. *J Immunol*, 1991, 147(9): 2913~921.
- 11 Haraoka S, Shimokama T, Watanabe T. Participation of T lymphocytes in atherogenesis: sequential and quantitative observation of aortic lesions of rats with diet-induced hypercholesterolaemia using an face double immunostaining. *Virchows Archiv*, 1995, 426: 307~315.
- 12 Kishikawa H, Shimokama T, Watanabe T. Localization of T lymphocytes and macrophages expressing IL-1, IL-2 receptor, IL-6 and TNF in human aortic intima, role of cell mediated immunity in human atherogenesis. *Virchows Archiv A Pathol Anat*, 1994, 423~442.

(1997-07-17 收到, 1998-04-20 修回)