

丙二醛对人外周血单核细胞趋化活性的影响

朱阎宏 邓仲端 倪娟

(同济医科大学病理学教研室, 武汉 430030)

主题词 丙二醛; 趋化因子; 单核细胞; 趋化作用; 血; 人体; 动脉粥样硬化

摘要 为探讨丙二醛对外周血单核细胞是否具有趋化作用, 本实验采用改良的 Boyden 小室微孔滤膜法进行单核细胞的趋化试验。用 Kikugawa 报道的方法制备丙二醛。结果发现, 低、中、高三种浓度 (0.05 mmol/L、0.5 mmol/L 和 1 mmol/L) 的丙二醛所诱导的单核细胞平均移动距离分别为 $85.37 \pm 10.44 \mu\text{m}$ 、 $109.03 \pm 7.88 \mu\text{m}$ 及 $122.67 \pm 6.25 \mu\text{m}$, 明显大于随机移动组 ($69.88 \pm 8.19 \mu\text{m}$)。方差分析表明, 低浓度丙二醛组与随机移动组相比, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 而中浓度和高浓度丙二醛组与随机移动组相比, 差异有极显著性意义 ($P < 0.001$)。而且, 丙二醛所诱导的单核细胞移动距离与其浓度呈剂量依赖关系。化学促动组单核细胞的平均移动距离 ($110.72 \pm 7.32 \mu\text{m}$) 亦明显大于随机移动组 ($P < 0.001$)。由此可见, 丙二醛对外周血单核细胞有明显的趋化作用和化学促动作用。此结果提示, 在动脉粥样硬化早期, 丙二醛在动脉内膜中单核/巨噬细胞的募集过程中起一定作用。

Observation on the Chemotactic Activity of Malondialdehyde for Human Peripheral Blood Monocyte

ZHU Yan-Hong, DENG Zhong-Duan and NI Juan

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

MeSH Malondialdehyde; Chemotactic Factors; Chemotaxis; Monocytes; Blood; Human Body; Atherosclerosis

ABSTRACT **Aim** This study was conducted to understand whether malondialdehyde (MDA) had a chemotactic activity for human peripheral blood monocytes. **Methods** The monocyte chemotaxis assay was performed by micropore filter method using a modified Boyden chamber. MDA was prepared by the method described by Kikugawa. **Results** The mean of migration distances ($85.37 \pm 10.44 \mu\text{m}$, $109.03 \pm 7.88 \mu\text{m}$, and $122.67 \pm 6.25 \mu\text{m}$) induced by MDA at low (0.05 mmol/L), middle (0.5 mmol/L), and high (1 mmol/L) concentrations, respectively, were significantly longer than that of the random migration group ($69.88 \pm 8.19 \mu\text{m}$). The analysis of variance showed that there was significant difference between the low concentration group and the random migration group ($P < 0.05$), whereas the mean of migration distances in the middle and high concentration groups and in the random migration group was highly statistically different ($P < 0.001$). Furthermore, the monocyte migration in the chemotaxis group was enhanced by MDA in a dose-dependent manner. The mean of migration distances in the chemokinesis group ($110.72 \pm 7.32 \mu\text{m}$) was significantly longer than that of the random migration group as well. **Conclusions** Malondialdehyde is significantly chemotactic and chemokinetic for peripheral blood monocytes. It suggests that malondialdehyde might play certain role in the recruitment of the monocytes/macrophages in the arterial intima during early stage of atherogenesis.

研究表明, 动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 发生和发展过程中的某些环节与脂质过氧化损伤有关。丙二醛为脂质过氧化最终产物之一, 其对细胞及其成分的毒性效应已引起人们的注意。然而, 丙二醛对人外周血单核细胞 (monocytes, MC) 是否具有趋化活性, 尚未见报道。我们分离人血 MC, 用 Boyden 小室微孔滤膜法检测丙二醛的趋化活性, 以探讨其在 As 发病中的作用。

1 材料与方法

本文为国家自然科学基金资助课题 (基金编号 39470289)

1.1 人血单核细胞的分离和鉴定

取健康成人全血, 肝素抗凝, 用淋巴细胞分离液离心, 分离人血单核细胞, 利用经明胶和自身血浆处理的塑料平皿收集附壁的 MC^[1]。加入 DMEM 培养基 (美国 Sigma 公司), 制成细胞悬液, 调细胞密度为 1×10^9 个/L, 用 Giemsa 和非特异酯酶染色检查, MC 纯度大于 95%, 台盼蓝拒染试验, 活细胞大于 96%。

1.2 活化血清制备^[2]

取 5 份健康人血, 分别析出血清, 将血清混合后加入干酵母 (200 g/L)。37℃ 水浴 30 min, 离心 3 000 r/min, 5 min, 吸出上清液, 56℃ 水浴 30 min, 此即为活化血清 (含 C5a, 对 MC 有很强的趋化活性, 作为

阳性对照组的趋化物)。- 30℃保存,使用时,用 DMEM 将其稀释成 5% (V/V)。

1.3 丙二醛的制备

参照 Kikugawa 等^[3]方法,略加改动。取四乙氧基丙烷(美国 Aldrich 产品) 8.2 mL,加浓盐酸 0.2 mL,再加入缓冲液(0.15 mol/L KH_2PO_4 -NaOH, pH 7.4)至 5 mL,摇匀,即为 10 mmol/L 丙二醛,使用时用 DMEM 将其分别稀释成 0.05 mmol/L、0.5 mmol/L 和 1 mmol/L 三种浓度的丙二醛溶液。

1.4 趋化实验

1.4.1 趋化实验的方法

用改良的 Boyden 小室检测丙二醛对 MC 的趋化性^[3]。上室加入不含丙二醛或含丙二醛的 MC 悬液。下室加满各种实验液,上下室之间隔以硝酸纤维素微孔滤膜(孔径 8 μm ,直径 13 mm,德国 Schleicher & Schuell 公司产品)。将小室置于 37℃、5% CO_2 培养箱中温育 80 min。取出滤膜,放入染色铜网中,Harris 苏木素染色。

1.4.2 趋化实验分组

实验分为四组:(1)随机移动组,即阴性对照组,上室加入用 DMEM 制成的 MC 悬液,下室加满与上室相同的培养基,检测在下室无丙二醛时 MC 的随机移动;(2)趋化运动组,上室加入 MC 悬液,下室分别加入含上述低、中、高三种不同浓度丙二醛的 DMEM,检测每一浓度的丙二醛对 MC 的趋化活性;(3)阳性对照组,上室加入 MC 悬液,下室加满活化血清;(4)化学促动组,上、下室均加入含 0.5 mmol/L 的丙二醛的 DMEM,检测上下室无丙二醛浓度梯度时 MC 的移动^[1]。

1.4.3 单核细胞移动距离的检测

在显微镜(物镜 $\times 40$,目镜 $\times 10$)下,用微调手轮调焦距对准滤膜表面(可见膜结构和大量 MC)作为起点,向下转动手轮,可见细胞数逐渐减少,至仅见 1~3 个 MC 时,即为 MC 移动的终点。从微调手轮的刻度上直接读出起点至终点的 μm 数,即为 MC 移动距离。每组两张膜,每张膜随机取 5 个高倍视野,实验重复 3 次,每组共得 30 个数据,算出平均值和标准差,并对各组数据进行方差分析。

2 结果

从表 1 (Table 1) 可看出,阳性对照组的 MC 移动距离明显大于随机移动组,差异有非常显著性意义($P < 0.001$)。低、中、高三种浓度(0.05 mmol/L、0.5 mmol/L 和 1 mmol/L)的丙二醛所诱导的单核细胞平均移动距离分别为 $85.37 \pm 10.44 \mu\text{m}$ 、 109.03

$\pm 7.88 \mu\text{m}$ 及 $122.67 \pm 6.25 \mu\text{m}$,明显大于随机移动组的 $69.88 \pm 8.19 \mu\text{m}$ 。方差分析表明,低浓度的丙二醛组与随机移动组相比,差异有显著性意义($P < 0.05$),中浓度和高浓度丙二醛与随机移动组相比,差异有极显著性意义($P < 0.001$)。而且将高、中、低三种浓度丙二醛的 MC 移动距离依次相比,差异亦有非常显著意义($P < 0.01$),即丙二醛诱导的 MC 移动呈剂量依赖关系。化学促动组的 MC 移动距离亦显著大于随机移动组,二者之间有极显著差异($P < 0.001$),但与中浓度丙二醛组之间无显著性差异($P > 0.05$)。

表 1. 不同浓度的丙二醛对人血单核细胞的趋化活性

Table 1. The chemotactic activity of MDA at different concentrations for monocytes

Groups	<i>n</i>	The mean of migration Distances ($\bar{x} \pm s$, μm)
Random migration	30	69.88 ± 8.19
0.05 mmol/L MDA	30	85.37 ± 10.44^a
0.5 mmol/L MDA	30	109.03 ± 7.88^{bc}
1.0 mmol/L MDA	30	122.67 ± 6.25^{bd}
Positive control	30	108.33 ± 5.04^b
Chemokinesis	30	110.72 ± 7.32^e

Notes: a: $P < 0.05$; b: $P < 0.001$; compared with random migration group; c: $P < 0.01$, compared with 0.05 mmol/L MDA group; d: $P < 0.01$, compared with 0.5 mmol/L MDA group.

3 讨论

巨噬细胞源性泡沫细胞是 As 病变中最早出现的细胞,研究 MC 或巨噬细胞的迁移,是阐明 As 斑块形成机制的一关键问题。近年研究表明,As 的发生发展与脂质过氧化作用有关,动脉的内皮细胞、平滑肌细胞均易受到脂质过氧化损伤而产生丙二醛等产物。据夏春枝、邓仲端等^[4]报道,使培养的人脐静脉和牛动脉内皮细胞暴露与联胺,引发其脂质过氧化损伤,经斑点杂交和 ELISA 证明,联胺可诱导其表达高水平的 MCP-1 mRNA 和蛋白,并与联胺的作用时间和浓度呈正相关。本实验结果表明,丙二醛对外周血 MC 具有明显的趋化作用和化学促动作用,而且丙二醛所诱导的 MC 移动与其浓度呈剂量依赖关系。两次实验虽从不同的角度进行观察,但结果完全一致。因此,丙二醛在 As 早期血 MC 迁移动脉内膜的过程中可能起一定作用。研究表明,培养的内皮细胞^[4,5]、平滑肌细胞^[6]和巨噬细胞^[8]均可产生 MCP-1 mRNA 和蛋白。

另外血小板源性生长因子、血小板第4因子、氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)及极低密度脂蛋白(oxidized very low density lipoprotein, ox-VLDL)^[8]对MC均有趋化作用。可能由于以上因素的协同作用,导致血MC移入内膜的量大大超过移出量,结果造成单核/巨噬细胞在内皮下间隙的募集。

脂质过氧化已引起人们的广泛注意,因其和很多疾病及衰老有着密切关系。丙二醛为脂质过氧化的终产物之一,其毒性作用受到重视。丙二醛不仅可以与蛋白质的游离氨基作用,引起蛋白质分子内交联,还可与核酸(DNA, RNA)及碱基、生物胺和磷脂如脑磷脂、卵磷脂等含有氨基的物质交联形成荧光发色团等。本实验证明,丙二醛对MC具有趋化作用和化学促动作用,有助于进一步阐明丙二醛引起组织和细胞损伤的机制,也为解释那些脂质过氧化相关的疾病病灶内单核/巨噬细胞的出现提供了实验依据。

参考文献

1 Freudlich B, Avdolic N. Use of gelatin/plasma coated flasks for iso-

lating human peripheral blood monocytes. *J Immunol Methods*, 1983, **62**: 31- 37

2 朱阎宏, 邓仲端, 徐增绶, 等. 兔主动脉平滑肌细胞培养产生单核细胞趋化因子的观察. *中华医学杂志*, 1991, **71**: 505- 507

3 Kikugawa K, Tsukuda K, Kurechi T. Studies on peroxidized lipids. I. Interaction of malondialdehyde with secondary amines and its relevance to nitrosamine formation. *Chem Pharmac Bull*, 1980, **28**: 3323- 331

4 夏春枝, 邓仲端. 脂质过氧化诱导培养的内皮细胞表达单核细胞趋化蛋白-1. *中国动脉硬化杂志*, 1997, **5**: 291- 294

5 于光耀, 邓仲端, 瞿智玲. 氧化修饰脂蛋白对内皮细胞的单核细胞趋化蛋白-1表达的影响. *中华病理学杂志*, 1998, **27**: 174- 176

6 Ruan QR, Deng ZD, Song JX. Very low density lipoprotein and oxidized very low density lipoprotein induce monocyte chemotactic protein 1 in rabbit aortic smooth muscle cells. *Chin Med J*, 1996, **109**: 206- 209

7 Wang GP, Deng ZD, Ni J, et al. Oxidized low density lipoprotein and very low density lipoprotein enhance expression of monocyte chemoattractant protein-1 in rabbit peritoneal exudate macrophages. *Atherosclerosis*, 1997, **133**: 31- 36

8 阮秋蓉, 邓仲端. 氧化低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白对单核细胞的趋化性研究. *中国动脉硬化杂志*, 1994, **2**: 77- 80

(此文 1999- 08- 15 收到, 1999- 11- 12 修回)

(此文编辑 胡必利)