

二甲亚砜抑制肿瘤坏死因子刺激内皮细胞粘附分子的表达

熊 燕

(湖南医科大学药理学教研室, 长沙 410078)

主题词 二甲亚砜; 肿瘤坏死因子- α ; 脐静脉; 内皮; 血管; 白细胞; 粘附; E-选择素; 细胞间粘附分子-1
摘要 为了探讨抗氧化剂二甲亚砜对白细胞粘附肿瘤坏死因子- α 活化的人脐静脉内皮细胞,及其对肿瘤坏死因子- α 刺激的内皮细胞表达粘附分子、E-选择素、细胞间粘附分子-1的影响,用酶联免疫吸附分析方法检测内皮细胞的粘附分子表达,应用孟加拉玫瑰红活细胞染色测定白细胞与内皮细胞的粘附。结果发现,用肿瘤坏死因子- α 刺激人脐静脉内皮细胞6h显著增加白细胞与内皮细胞的粘附($P < 0.01$);用肿瘤坏死因子- α 孵育人脐静脉内皮细胞4h或18h可明显诱导E-选择素的表达和增加细胞间粘附分子的构成表达($P < 0.01$);用2.5%二甲亚砜预孵育人脐静脉内皮细胞1h再与肿瘤坏死因子- α 共同孵育细胞明显减少白细胞与内皮细胞的粘附,并抑制内皮细胞表达E-选择素和细胞间粘附分子-1($P < 0.01$)。以上提示抗氧化剂二甲亚砜可抑制肿瘤坏死因子- α 活化的人脐静脉内皮细胞表达E-选择素和细胞间粘附分子-1,减少白细胞与活化内皮细胞的粘附,为研究抗氧化剂的抗炎及防治动脉粥样硬化作用提供实验依据。

Dimethyl Sulfoxide Inhibits the Expression of Adhesive Molecules on Endothelial Cells Stimulated by Tumor Necrosis Factor- α

XIONG Yan

(Department of Pharmacology, Hunan Medical University, Changsha 410078, China)

MeSH Dimethyl Sulfoxide; Tumor Necrosis Factor- α ; Umbilical Veins; Endothelial, Vascular; Neutrophils; Adhesive; E-Selectin; Intercellular Adhesion Molecule-1

ABSTRACT **Aim** To investigate the effects of dimethyl sulfoxide (DMSO), an antioxidant, on neutrophils adhesion to tumor necrosis factor- α (TNF- α)-activated human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), and the expression of adhesion molecules E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on TNF- α -stimulated endothelial cells. **Methods** The expression of adhesion molecules on HUVEC was measured by a cellular enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) method, and the adherence of neutrophils to activated HUVEC was detected by Rose Bengal assay. **Results** After stimulation of HUVEC with TNF- α for 6 h, the adherence of neutrophils to endothelial cells was increased compared with control group ($P < 0.01$). Exposure HUVEC to TNF- α for 4 h or 18 h induced E-selectin expression and increased constitutive expression of ICAM-1 ($P < 0.01$). Pretreatment of HUVEC with 2.5% DMSO for 1 h before stimulation with TNF- α produced a decrease in the neutrophil adhesion and inhibition in the expression of E-selectin and ICAM-1 ($P < 0.01$). **Conclusion** DMSO decrease neutrophil adhesion to TNF- α -activated endothelial cell by inhibiting the expression of E-selectin and ICAM-1. This result may contribute to the anti-inflammatory and antiatherosclerotic potential of DMSO.

白细胞粘附血管内皮是各种炎症反应的重要过程,该过程决定于白细胞与内皮细胞表面粘附分子的相互作用。已知肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)可刺激内皮细胞表达细胞间粘附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)和E-选择素,从而促进白细胞粘附于血管内皮^[1]。

动脉粥样硬化是一种血管炎症性疾病,寻找抗白细胞粘附,抑制内皮细胞粘附分子表达的药物对防治动脉粥样硬化具有重要意义。文献[2,3]报道,抗氧化剂维生素E可改善动脉粥样硬化动物血管形态和功能的损害,抑制内皮细胞粘附分子表达。

但氧自由基清除剂二甲亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)能否抑制白细胞粘附及内皮细胞粘附分子表达还未见文献报道。本实验采用培养的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC),研究DMSO对TNF- α 诱导白细胞与内皮细胞的粘附及TNF- α 刺激内皮细胞E-选择素、ICAM-1表达的影响。

1 材料与方 法

1.1 药品和试剂

人类重组TNF- α 及鼠抗人E-选择素、ICAM-1的单克隆抗体系R&D System(美国)产品;辣根

过氧化酶标记的兔抗鼠抗体系 Dako(美国) 产品; DMSO、Percoll、噻唑蓝 (MTT) 等试剂均购自美国 Sigma 公司。

1.2 细胞培养

将原代人脐静脉内皮细胞和培养基 200 (含低血清生长补充物质) (购自日本 Cascade Biologics) 置于 37°C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 取 2~5 代的细胞用于实验。

1.3 人血中白细胞的分离

用 Percoll 梯度离心分离人外周静脉血中的多形核白细胞。取 15 mL 消毒、有盖的离心管一支, 先在管底加入 75% Percoll 3~5 mL, 再在其上轻轻地加入 65% Percoll 3~5 mL, 然后在最上层轻轻沿管壁加入用肝素抗凝的人外周静脉血 3~5 mL, 1 500 r/min 离心 25 min, 将白细胞轻轻吸至另管, 用磷酸缓冲液洗两次。用台盼兰染色行细胞计数, 并观察活细胞数目。用培养液稀释成每毫升含 0.5×10^6 个的细胞悬液待用。

1.4 白细胞粘附测定

用孟加拉玫瑰红染色测定白细胞粘附培养的 hUVEC。将 hUVEC 按 1.25×10^4 个/孔的密度接种于 96 孔板, 置二氧化碳培养箱中培养 48 h 后用于实验。将实验分成正常对照组、TNF- α 处理组、DMSO 对照组和 DMSO + TNF- α 处理组。先用 2.5% DMSO 预孵育细胞 1 h, 再将 DMSO 与 TNF- α (2 μ g/L) 共同孵育 hUVEC 6 h。用培养液冲洗细胞一次, 再每孔加入白细胞悬液 200 μ L, 37°C 孵育 15~30 min; 用培养液洗去未粘附的白细胞, 每孔加入用磷酸缓冲液配制的 0.25% 孟加拉玫瑰红染料 100 μ L, 室温下染色 5 min; 然后吸去染料, 并用培养液洗二次, 每孔加入用磷酸缓冲液 1:1 稀释的乙醇 200 μ L, 30 min 后在 570 nm 波长下测定每孔的光密度。

1.5 细胞表面粘附分子表达的测定

按文献[4]方法用细胞-酶联免疫吸附分析法测定细胞表面粘附分子 E-选择素和 ICAM-1 的表达。将接种于 96 孔板的 hUVEC 培养 48 h 后, 分别用各种浓度 (0.1, 0.5, 1, 5, 10 和 50 μ g/L) 的 TNF- α 孵育 4 h (测 E-选择素表达), 或 18 h (测 ICAM-1 表达), 以检测 TNF- α 刺激 hUVEC 表达 E-选择素和 ICAM-1 的量效关系。在药物处理组, 先将 2.5% DMSO 与细胞孵育 1 h, 再将 DMSO 与 TNF- α (2 μ g/L) 共同孵育 hUVEC 4 h 或 18 h; 在 DMSO 对照组或 TNF- α 处理组, 细胞仅与 DMSO (2.5%) 或仅与 TNF- α (2 μ g/L) 孵育 4 h 或 18 h。细胞冲洗两次后用 1% 多聚甲醛固定, 经 2% 胎牛血清白蛋白封闭

后加入鼠抗人 E-选择素或 ICAM-1 的单克隆抗体, 再加辣根过氧化酶标记的二抗及底物, 终止反应后在 490 nm 波长下测定每孔的光密度。

1.6 细胞活性测定

用 MTT 方法测定药物对细胞活性的影响。将接种于 96 孔板培养的 hUVEC 经上述各组药物孵育后, 每孔加入 5% MTT 10 μ L, 置 37°C 继续孵育 4 h, 倾去培养液, 每孔加入 DMSO 100 μ L, 5~10 min 后在 570 nm 波长处读取每孔的光密度。

1.6 统计

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 ANOVA 和 turkey *t* 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 二甲亚砜对白细胞粘附的影响

TNF- α (2 μ g/L) 孵育 hUVEC 6 h 后, 白细胞与 hUVEC 的粘附明显增加。预先用 2.5% DMSO 预孵育 hUVEC 1 h, 再与 TNF- α (2 μ g/L) 共同孵育 6 h, 能显著减少白细胞与 hUVEC 的粘附。单独用 2.5% DMSO 孵育 hUVEC 6 h, 对白细胞的粘附无明显影响 (图 1, Figure 1)。

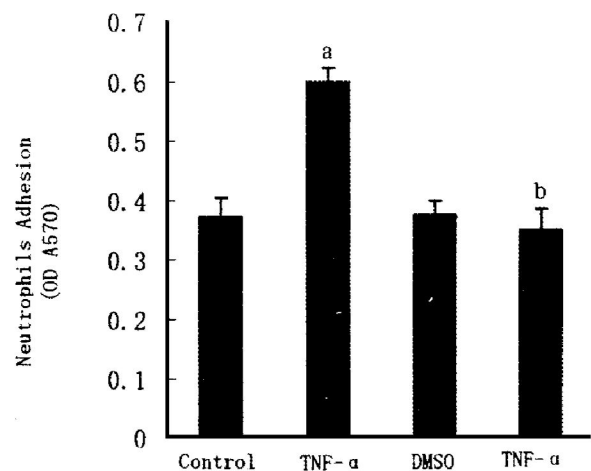


图 1. DMSO 对白细胞粘附内皮细胞的影响

Figure 1. Effect of DMSO on neutrophils adhesion to hUVEC stimulated with TNF- α ($\bar{x} \pm s$, $n=4$). a: $P < 0.01$, compared with control group, b: $P < 0.01$, compared with TNF- α group

2.2 二甲亚砜对内皮细胞粘附分子表达的影响

与文献[1,4]报道一致, 本实验证实 TNF- α (0.1~50 μ g/L) 孵育 hUVEC 4 h, 明显诱导内皮细胞表达粘附分子 E-选择素; 用 TNF- α (0.1~50 μ g/L) 孵育 hUVEC 18 h 亦显著增加粘附分子 ICAM-1 的表达 (图 2, Figure 2)。本实验发现用 2.5% DMSO 预处理 hUVEC 1 h, 明显抑制 TNF- α 诱导的 E-选择素和 ICAM-1 的表达。DMSO 单独孵育 hUVEC,

对 E- 选择素和 ICAM- 1 的表达无明显影响(图 3, Figure 3)。

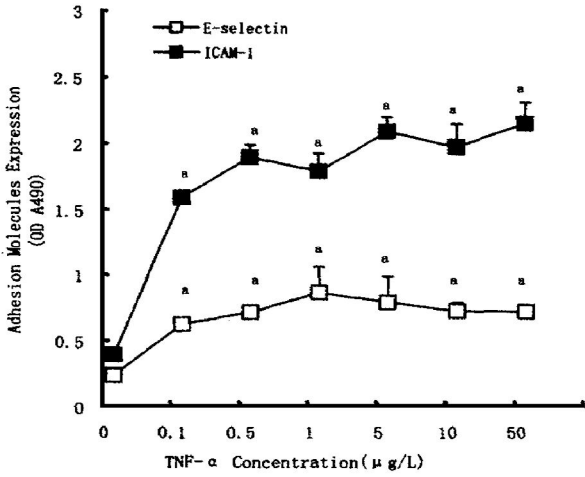


图 2. 肿瘤坏死因子对人脐静脉内皮细胞粘附分子表达的影响

Figure 2. Effect of TNF-α on the expression of adhesion molecules on hUVEC (x ± s, n = 4). a: P < 0.01, compared with control group

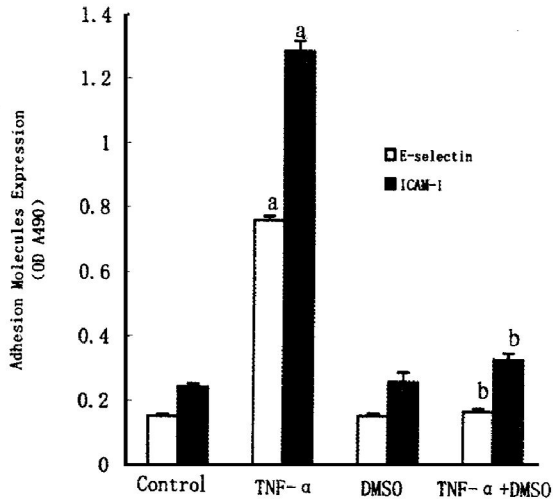


图 3. 二甲亚砜对肿瘤坏死因子刺激人脐静脉内皮细胞粘附分子表达的影响

Figure 3. Effect of DMSO on the expression of adhesion molecules on hUVEC stimulated with TNF-α (x ± s, n = 4). a: P < 0.01, compared with control group, b: P < 0.01 compared with TNF-α group

2.3 二甲亚砜对细胞活性的影响

为了排除 DMSO 对内皮细胞的直接毒性作用, 本实验用 MTT 法检测了以上所用药物对细胞活性的影响。结果显示: 无论是用 2.5% DMSO 或 TNF-α (2 μg/L) 单独孵育 hUVEC 18 h, 还是用 2.5% DMSO + TNF-α (2 μg/L) 共同孵育 hUVEC 18 h, 其细胞活性与未加药物孵育的正常对照组均无明显差异(图 4, Figure 4)。该结果提示本实验中 DMSO 对 TNF-

α 刺激 hUVEC 表达 E- 选择素和 ICAM- 1 的抑制作用不是由于药物对细胞的直接毒性作用使细胞活性降低所致。

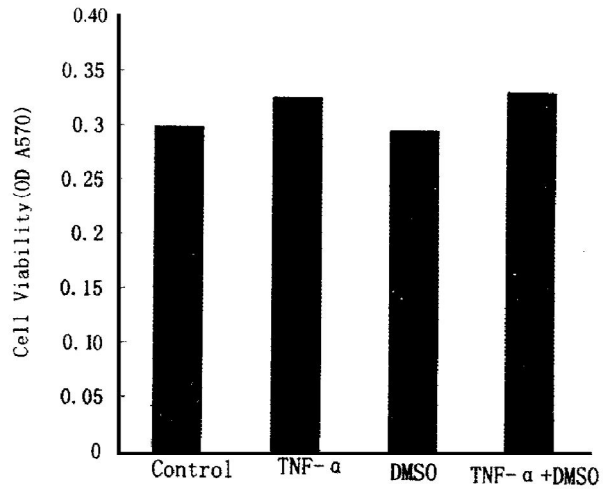


图 4. 二甲亚砜对人脐静脉内皮细胞活性的影响

Figure 4. Effect of DMSO on cell viability of hUVEC

3 讨论

白细胞粘附、浸润血管壁是动脉粥样硬化的重要病理过程, 白细胞与内皮细胞相互作用的分子基础在于细胞表面 E- 选择素和 ICAM- 1 等粘附分子的表达及细胞因子对粘附分子表达的调节。E- 选择素是内皮细胞特异性诱导表达的一种糖蛋白。静息状态的内皮细胞不表达 E- 选择素, 只有在内皮细胞被 TNF-α、白细胞介素- 1β 等炎性细胞因子和细菌内毒素活化后才快速短暂表达, 4~ 6 h 达高峰, E- 选择素主要介导白细胞与内皮细胞起始粘附作用。ICAM- 1 是血管内皮细胞构成表达的一种糖蛋白, 静止状态的内皮细胞亦有少量表达, 当内皮细胞被炎性细胞因子刺激 4 h 后表达 ICAM- 1 增加, 12 h 达高峰, ICAM- 1 主要介导多形核白细胞、淋巴细胞和单核细胞的粘附, 促进炎症的发生发展^[1]。

本实验肯定了以前的观察, hUVEC 被 TNF-α (2 μg/L) 活化后, 与白细胞的粘附明显增加; 进一步的研究表明 TNF-α 的这种作用是通过诱导内皮细胞表达粘附分子 E- 选择素和 ICAM- 1 所致。本实验发现: 在培养的 hUVEC, 抗氧化剂 DMSO 明显抑制 TNF-α 诱导 E- 选择素和 ICAM- 1 的表达, 从而减少白细胞粘附 TNF-α 活化的内皮细胞。DMSO 的这种抑制作用不是因其对内皮细胞的直接毒性作用使细胞活性降低导致的表达减少, 因为本实验用 MTT 方法检测细胞活性表明: 用 DMSO 孵育血管内皮细胞 18 h 对 hUVEC 的细胞活性无明显影响。用 DMSO 单独孵育 hUVEC, 不诱导 E- 选择素的表达,

也不影响 ICAM-1 的构成表达。有关 DMSO 抑制 TNF- α 诱导 hUVEC 表达 E-选择素和 ICAM-1 的分子机理尚不清楚。

大量研究表明:TNF- α 刺激 hUVEC 表达 E-选择素和 ICAM-1 是通过活化核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B) 促进 E-选择素和 ICAM-1 基因的转录^[5]。在未受刺激的细胞, NF- κ B 以潜伏形式存在于胞浆中, 即由含 P50 和 P65 亚型的异二倍体组成, 并与抑制蛋白(I κ B) 结合成复合物。当细胞受到刺激时(如 TNF- α), 活化细胞传导通路, I κ B 被磷酸化, 并与 NF- α 解离成为一种活化状态, 这样就允许 NF- κ B 进入核内与 NF- κ B 结合部位结合, 从而活化基因转录。有研究表明, 在 ICAM-1 和 E-选择素基因的启动子上都有 NF- κ B 的结合部位(6~7); 动脉粥样硬化斑块的内皮细胞中的 NF- κ B 也是以一种活化形式存在^[8]。越来越多的文献报道氧自由基在 NF- κ B 活化中起重要作用, 过氧化氢在转化的人脐静脉内皮细胞株可直接活化 NF- κ B; TNF- α 诱导的 NF- κ B 活化也与活性氧中间产物生成及脂质过氧化有关^[9]; 抗氧化剂维生素 E、丙丁酚、N-乙酰-L-半胱氨酸及过氧化氢酶可抑制 TNF- α 、氧化型低密度脂蛋白等诱导的 NF- κ B 活化及粘附分子表达^[3,11]。DMSO 是羟自由基的清除剂, 以前的研究表明: 羟自由基是一个极其活泼的氧化剂, 它可由超氧阴离子和过氧化氢经 Haber-Weiss 反应或 Fenton 反应生成, 对细胞的损害最严重。文献[10]报道: 在内毒素引起的肝损害动物模型, 羟自由基的清除剂 DMSO 可抑制内毒素诱导的 NF- κ B 活化和 ICAM-1 的表达, 保护肝细胞对抗内毒素的损害。基于文献报道 TNF- α 诱导 hUVEC 表达 E-选择素和 ICAM-1 是通过活化 NF- κ B 中介以及 DMSO 可抑制肝细胞 NF- κ B 活化, 故推测本实验在培养的人脐静脉内皮细胞, DMSO 抑制 TNF- α 诱导 E-选择素和 ICAM-1 表达也可能是通过抑制 NF- κ B 的活化所致。然而, 有关 DMSO 抑制 TNF- α 诱导内皮细胞表达 E-选择素和 ICAM-1 的确切机理还有待进一步研究证实。总之, 本研究发现抗氧化剂 DMSO 抑制 TNF- α 诱导

人脐静脉内皮细胞表达粘附分子 E-选择素和 ICAM-1, 减少白细胞与内皮细胞的粘附, 为研究抗氧化剂的抗炎及防治动脉粥样硬化作用提供实验依据。

参考文献

- 1 Leeuwenberg JFM, Smeets EF, Neefjes JJ, et al. E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology*, 1992, **77**(4): 543-549
- 2 Murohara T, Scalia R, Lefer AM. Lysophosphatidylcholine promotes P-selectin expression in platelets and endothelial cells: Possible involvement of protein kinase C activation and its inhibition by nitric oxide donors. *Circ Res*, 1996, **78**(5): 780-789
- 3 Cominacini L, Garbin U, Pasini AF, et al. Antioxidants inhibit the expression of intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 induced by oxidized LDL on human umbilical vein endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, 1997, **22**(1/2): 117-127
- 4 Minter AJ, Keoshkerian E, Chesteman CN, et al. Fibroblast growth factor and heparin protect endothelial cells from the effects of interleukin 1. *J Cellular Physiol*, 1996, **167**(2): 229-237
- 5 Chen CC, Rosenbloom CL, Anderson DC, et al. Selective inhibition of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular adhesion molecule-1 expression by inhibitors of I κ B- α phosphorylation. *J Immunol*, 1995, **155**(7): 3538-545
- 6 Montgomery KF, Osborn L, Hession C, et al. Activation of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(15): 6523-527
- 7 Hou J, Baichwal V, Cao Z. Regulatory elements and transcription factors controlling basal and cytokine-induced expression of the gene encoding intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(24): 11641-645
- 8 Brand K, Page S, Rogler G, et al. Activated transcription factor nuclear factor- κ B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest*, 1996, **97**(7): 1715-722
- 9 Bowie AG, Moynagh PN, O'Neill LAJ. Lipid peroxidation is involved in the activation of NF- α B by tumor necrosis factor but not interleukin-1 in the human endothelial cell line ECV304. *J Biological Chemistry*, 1997, **272**(41): 25941-950
- 10 Essani NA, Fisher MA, Jaeschke H. Inhibition of NF- α B activation by dimethyl sulfoxide correlates with suppression of TNF- α formation, reduced ICAM-1 gene transcription, and protection against endotoxin-induced liver injury. *Shock*, 1997, **7**(2): 90-96

(此文 1999-08-10 收到, 1999-11-07 修回)

(此文编辑 朱雯霞)