

抗氧化剂对脂质过氧化内皮细胞表达细胞粘附分子的影响

尹鸿操 陈铁镇 杨向红 董玉兰 洪伟

(中国医科大学实验病理学研究室, 沈阳 110001)

主题词 抗氧化剂; 脂质过氧化; 内皮细胞; 单核细胞; 血管细胞粘附分子-1; 内皮细胞白细胞粘附分子-1; 动脉粥样硬化

摘要 为探讨抗氧化剂维生素 E 和元素硒对脂质过氧化诱导内皮细胞表达细胞粘附分子及单核细胞粘附的影响, 用联胺诱发培养内皮细胞脂质过氧化, 检测维生素 E 和元素硒对单核细胞粘附的影响, 用免疫组化及共焦显微镜观察维生素 E 和元素硒对内皮细胞表达血管细胞粘附分子-1 及内皮细胞白细胞粘附分子-1 的影响。结果显示抗氧化剂维生素 E 和元素硒可抑制内皮细胞脂质过氧化, 抑制血管细胞粘附分子-1 及内皮细胞白细胞粘附分子-1 表达, 减少单核细胞粘附。提示抗氧化剂有可能通过抑制内皮细胞表达细胞粘附分子, 减少单核细胞粘附而延缓动脉粥样硬化病变的发生及发展。

Effect of Antioxidant on the Expression of Cellular Adhesion Molecules in Cultured Endothelial Cells Induced by Peroxidation

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

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

MeSH Antioxidants; Lipid Peroxidation; Endothelia Cell; Monocytes; Vascular Cell Adhesion Molecule - 1; Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule- 1; Atherosclerosis

ABSTRACT **Aim** To investigate the effect of antioxidant Vitamine E and Selenium on the expression of cellular adhesion molecules (CAMs) induced by lipid peroxidation(LP_x) in cultured endothelial cells and monocytes(MC) adherence to EC. **Methods** LP_x was initiated with diamide(DM). Effect of Vitamine E and Selenium on the expression of vascular adhesion molecule- 1(VCAM- 1) and endothelial leucocyte adhesion molecule- 1(ELAM- 1) was studied under laser confocal microscope, MC adherence to EC was measured. **Results**

Vitamine E and Selenium could decrease the content of lipid peroxid, reduce VCAM- 1 and ELAM- 1 expression and MC adherence to EC incubated with DM. **Conclusion** Antioxidant could inhibit VCAM- 1 and ELAM- 1 expression induced by LP_x to reduce MC adherence to EC and may possibly prevent the development of atherosclerosis (As) lesion.

以联胺诱发的脂质过氧化(lipid peroxidation, LP_x)可诱导培养人内皮细胞(endothelial cells, EC)表达血管细胞粘附分子-1(vascular cell adhesion molecule- 1, VCAM- 1)及内皮细胞白细胞粘附分子-1(endothelial leucocyte adhesion molecule- 1, ELAM- 1), 使单核细胞(monocyte, MC)在内皮细胞上粘附及向 EC 下迁移显著增加^[1,2]。维生素 E 和硒(selenium, Se)是体内抗氧化物质, 具有协同作用, 对发生 LP_x 的培养 EC 有多方面的保护作用^[3]。本实验以联胺诱发 EC 脂质过氧化, 观察维生素 E 和硒对 EC 表达 VCAM- 1 及 ELAM- 1 的影响, 进一步探讨抗氧化剂在动脉粥样硬化防治中的作用。

1 材料及方法

1.1 人内皮细胞的分离及培养

采用改进的 Jaffe 氏法^[4], 取健康新生儿脐带用 0.125% 的胰蛋白酶灌注脐静脉, 37℃, 5 min, 然后离

心收集 EC, 用含 20% 胎牛血清的 RPMI- 164(GIBCO)培养液培养。

1.2 人单核细胞的分离及培养

采用密度梯度离心法^[5]分离人新鲜静脉血中的 MC, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI- 1640 培养液培养。

1.3 内皮细胞分组

将 EC 培养在 24 孔培养板内, 培养至亚汇合状态, 分为实验组及对照组, 在以下每项实验中各用每组 4 个培养孔的 EC。对照组用正常的 RPMI- 1640 培养液继续培养。实验组分为无抗氧化剂组(简称 G- 1)及加抗氧化剂组(简称 G- 2)。无抗氧化剂组(G- 1)用正常的 RPMI- 1640 培养液继续培养; 加抗氧化剂组(G- 2)用含抗氧化剂的 RPMI- 1640 培养液(亚硒酸钠 0.2 mg/L, 醋酸生育酚 50 mg/L)继续培养。将以上各组 EC 培养至汇合状态, 对照组用正常培养液继续培养, 实验组(包括 G- 1 及 G- 2 组)加含联胺的培养液(0.10×10^{-4} mol/L), 培养 60

min, 弃掉含联胺培养液进行下一步实验。

1.4 检测内皮细胞过氧化脂质含量

采用 γ TBA 法^[6]检测 EC 过氧化脂质含量。

1.5 检测单核细胞粘附率

在培养孔内加入 MC 悬液, 培养 30 min, 吸出未粘附的 MC, 根据加入的 MC 总量计算 MC 粘附率^[2]。

1.6 检测内皮细胞粘附分子表达量

取对照组、G-1 及 G-2 组细胞各 4 孔, 用正常培养液继续培养, 分别在第 1、2、3、4 和 8 h 用 95% 甲醇固定 EC, 经 VCAM-1 或 ELAM-1 免疫荧光染色, 每孔随机选 100 个细胞, 用激光共焦显微镜检测其平均荧光强度, 以像素值(pixel intensity)表示。

2 结果

2.1 内皮细胞过氧化脂质含量检测

从表 1 (Table 1) 可见, 实验组的丙二醛(malondialdehyde, MDA) 含量均有所升高, 其中无抗氧化剂组较对照组显著升高($P < 0.01$), 加抗氧化剂组较无抗氧化剂组显著降低($P < 0.05$)。

表 1. 内皮细胞丙二醛的含量

Table 1. MDA content in the cultured EC (nmol/well, $\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Groups	MDA
Control	1.372 ± 0.122
No- antioxidant	2.973 ± 0.304^b
Antioxidant	1.412 ± 0.118^a

a: $P < 0.05$, compared with no-antioxidant group, b: $P < 0.01$, compared with control group

2.2 单核细胞粘附率检测

无抗氧化剂组的 MC 粘附率在各时间较对照组均显著升高($P < 0.01$), 加抗氧化剂组显著低于无抗氧化剂组($P < 0.01$) (图 1, Figure 1)。

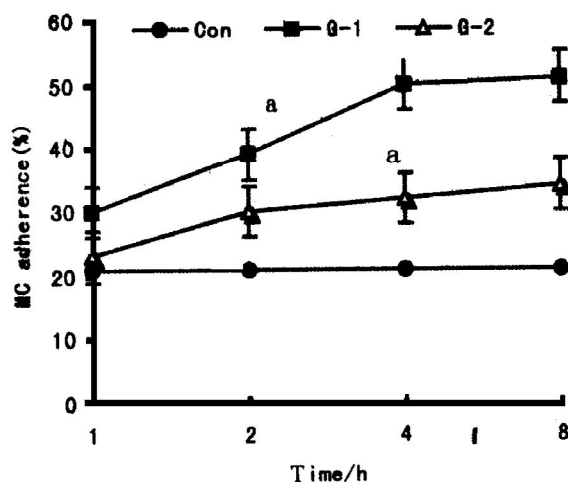


图 1. 各组单核细胞的粘附率

Figure 1. Vitamin E and Se reduced MC adherence to the EC incubated with DM. a: $P < 0.01$, compared with control group or 0.1×10^{-4} mol/L DM group

2.3 对内皮细胞白细胞粘附分子-1 表达的影响

对照组: 呈阴性反应。实验组: 无抗氧化剂组 (G-1) 呈阳性反应, 细胞表面有很强的荧光 (图 2 a, Figure 2 a)。加抗氧化剂组 (G-2) 呈阳性反应, 但细胞表面荧光强度弱于 G-1 组 (图 2b, Figure 2b)。经检测 G-2 组平均荧光强度在各时点均显著低于 G-1 组($P < 0.01$) (图 3, Figure 3)。

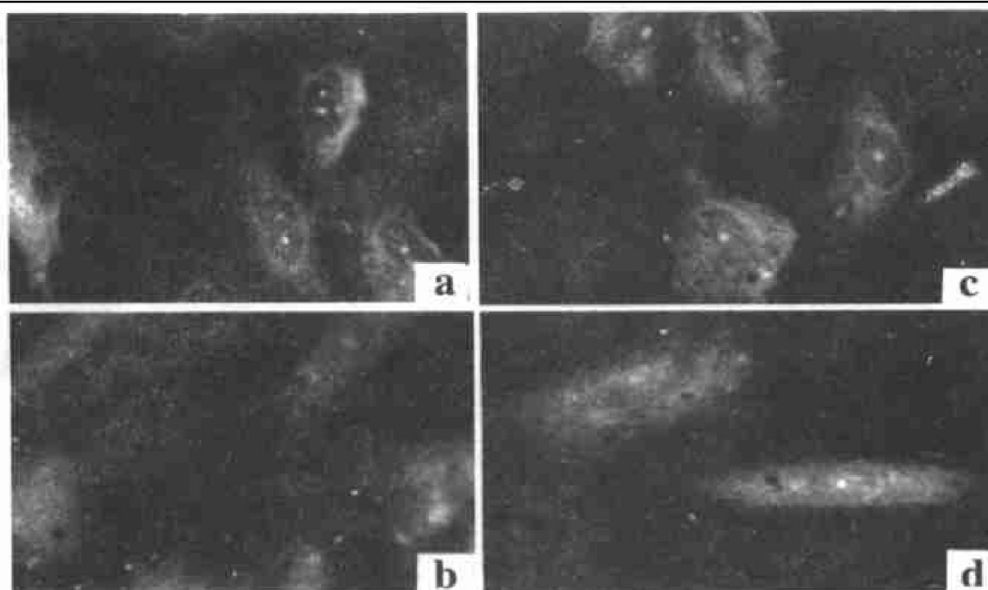


图 2. 各组内皮细胞表面粘附分子的表达

Figure 2. After incubated with DM, EC show positive immunofluorescence staining with anti-ELAM-1 antibody (2a, 2b) and anti-VCAM-1 antibody (2c, 2d). 2b, 2d: Antioxidant VitE and Se were added in the medium

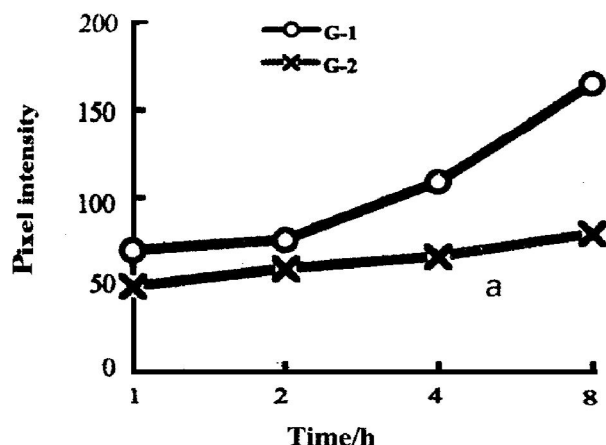


图3. 抗氧化剂对内皮细胞白细胞粘附分子-1表达的影响

Figure 3. Vit E and Se inhibited ELAM-1 expression induced by LPx. G-1: 0.1×10^{-4} mol/L DM, G-2: 0.1×10^{-4} mol/L DM with VitE and Se. a: $P < 0.01$, compared with G-1 group

2.4 对血管细胞粘附分子-1表达的影响

对照组: 呈阴性反应。

实验组均呈阳性反应, 加抗氧化剂组 EC 荧光强度弱于无抗氧化剂组(图 2c, d, Figure 2c, d)。经检测加抗氧化剂组的平均荧光强度在各时间点均显著低于无抗氧化剂组($P < 0.01$)(图 4, Figure 4)。

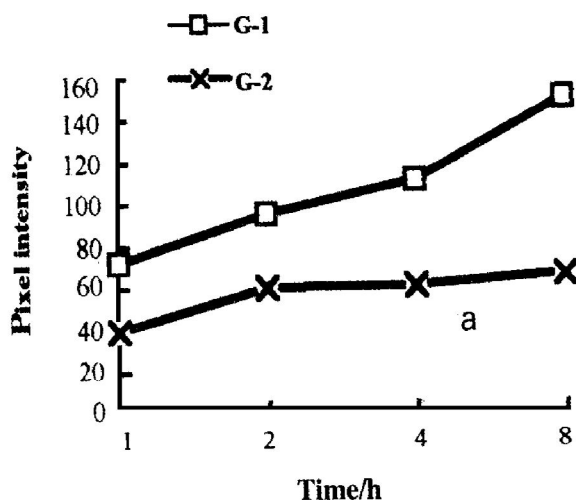


图4. 抗氧化剂对血管细胞粘附分子-1表达的影响

Figure 4. Vit E and Se inhibited VCAM-1 expression induced by LPx in cultured EC. G-1: 0.1×10^{-4} mol/L DM, G-2: 0.1×10^{-4} mol/L DM with VitE and Se. a: $P < 0.01$, compared with G-1 group

3 讨论

以联胺诱发的 LPx 不仅引起 EC 结构损伤, 还可诱导 EC 表达 VCAM-1 及 ELAM-1, 使 MC 粘附并迁移到 EC 下^[1,2,7]。在体内 LPx 可造成 MC 在 EC 上

粘附及向 EC 下迁移增多, 进而可能形成早期动脉粥样硬化病变。机体在正常情况下通过酶和非酶系统产生活性氧自由基并存在一定量的过氧化脂质^[8]。同时机体内也存在清除自由基及抗过氧化的系统, 如硒谷胱甘肽过氧化物酶、维生素 E 和抗氧化蛋白等^[9]。机体的抗氧化系统功能正常才能不断清除机体产生的活性氧自由基和过氧化脂质, 保护机体免受脂质过氧化损伤, 所以提高机体的抗氧化能力对动脉粥样硬化的防治有重要意义。

维生素 E 是重要的脂溶性抗氧化剂, 硒是硒谷胱甘肽过氧化物酶的活性中心, 这两种物质都能增强机体的抗氧化能力。本研究室已报道^[3], 维生素 E 和硒对培养 EC 的脂质过氧化损伤有多方面的保护作用。本实验结果显示, 维生素 E 和硒不仅能降低联胺诱发的 LPx, 减少 EC 过氧化脂质含量, 还能显著减少 VCAM-1 和 ELAM-1 的表达量, 减少 MC 粘附率。这些结果提示, 抗氧化剂能通过降低内皮细胞脂质过氧化, 减少内皮细胞上细胞粘附分子表达量, 减少单核细胞在内皮细胞上的粘附及向内皮下迁移从而延缓动脉粥样硬化病变的发生及发展, 深入研究抗氧化剂的上述作用有利于动脉粥样硬化的防治。

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 尹鸿操, 陈铁镇, 董玉兰, 等. 脂质过氧化对培养内皮细胞表达细胞粘附分子的影响. 中国动脉硬化杂志, 1998, 6(2): 120-123
- 3 杨向红, 陈铁镇. 脂质过氧化对内皮细胞的损伤及抗氧化剂的保护作用. 中华病理学杂志, 1990, 19(1): 8-11
- 4 陈铁镇, 张宝庚, 王速, 等. 培养人内皮细胞的研究. 中华病理学杂志, 1987, 16(2): 136-139
- 5 Recalde HR. A simple method of obtaining monocytes in suspension. J Immunol Methods, 1984, 69: 71-77
- 6 Hiroshi O, Nobuko O, Kunio Y. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem, 1979, 95: 351-358
- 7 陈铁镇, 宋继渴, 杨向红, 等. 脂质过氧化对培养人内皮细胞的损伤作用. 中华病理学杂志, 1989, 18(1): 15-17
- 8 陈瑗, 周玫(主编). 自由基医学. 北京: 人民军医出版社, 1991; 13-29
- 9 陈瑗, 周玫(主编). 自由基医学. 北京: 人民军医出版社, 1991; 55-83

(此文 1999-01-03 收到, 1999-08-30 修回)

(此文编辑 朱雯霞)