

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2001)-02-0096-04

脂质过氧化诱导培养的人脐静脉内皮 细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α

杨丽敏, 邓仲端, 瞿智玲, 倪娟

(华中科技大学同济医学院病理学教研室, 武汉 430030)

[主题词] 脂质过氧化; 内皮, 血管; 巨噬细胞炎性蛋白 1 α ; 逆转录; 多聚酶链反应; 动脉粥样硬化

[摘要] 为了解脂质过氧化损伤能否诱导内皮细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α , 用不同浓度(1、5 和 10 μ mol/L)的联胺刺激培养人脐静脉内皮细胞脂质过氧化损伤, 用硫代巴比妥酸荧光微量测定法测定样品中的丙二醛含量; 用一步法提取 RNA, 反转录多聚酶链反应检测巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA; 用免疫细胞化学法检测巨噬细胞炎性蛋白 1 α 蛋白的表达。结果发现, 随联胺浓度增高, 各组丙二醛含量依次增高($P < 0.05$), 分别为对照组的 2.0、5.3 和 8.6 倍($F = 138.64, P < 0.01$)。正常内皮细胞表达较低水平的巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA, 加联胺后各组巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA 表达明显增加, 分别是对照组的 4、6 和 3.5 倍。免疫细胞化学显示, 巨噬细胞炎性蛋白 1 α 蛋白为棕黄色颗粒, 主要分布于胞浆的核周区。图像分析结果显示各组细胞平均吸光度值增加($P < 0.05$), 分别是对照组的 1.4、1.9 和 1.3 倍($F = 68.60, P < 0.01$)。以上结果提示, 联胺能引起内皮细胞脂质过氧化损伤, 并诱导其产生巨噬细胞炎性蛋白 1 α , 吸引单核细胞粘附于内皮, 并向内皮下间隙迁移, 在动脉粥样硬化发生过程中可能起重要作用。

[中图分类号] R322.12

[文献标识码] A

Lipid Peroxidation Induces the Expression of Macrophage Inflammatory Protein-100 in Cultured Human Umbilical Ven Endothelial Cells

YANG Li-Min, DENG Zhong-Duan, QU Zhi-Ling, and NI Juan

(Department of Pathology, Huazhong University of Science Technology, Tongji School of Medicine, Wuhan 430030, China)

MeSH Lipid Peroxidation; Endothelium, Vascular; Macrophage Inflammatory Protein-1 α ; Transcription, Genetic; Polymerase Chain Reaction; Atherosclerosis

ABSTRACT **Aim** To investigate whether lipid peroxidation injury to cultured endothelial cells (ECs) induces the expression of macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α). **Methods** The cultured human umbilical vein ECs were randomly divided into the A, B and C groups, cultured in the media containing 1 μ mol/L, 5 μ mol/L and 10 μ mol/L diamide respectively and the control group cultured in the media without diamide. After exposure of ECs to diamide for 4 h, the lipoperoxide in the ECs was determined by thiobarbituric acid fluorophotometry; total cellular RNA was extracted from the cultured ECs by the single step method, and the expression of MIP-1 α mRNA was determined by RT-PCR; the MIP-1 α protein in ECs was determined by immunocytochemistry. **Results** The malondialdehyde content in ECs in group A, B and C were 2.0-fold and 8.6-fold as much as that there was significant difference between experiment group and control group ($F = 138.64, P < 0.01$), and Q test also revealed statistical difference among the experiment groups ($P < 0.05$). RT-PCR showed that the MIP-1 α mRNA expression in ECs in group A, B and C were 4-fold, 6-fold and 3.5-fold as much as that in the control group. Immunocytochemistry assay showed that MIP-1 α mRNA Protein was granular brown substance which located mainly in the cytoplasm around the nuclei. Diamide induced stronger expression of MIP-1 α protein in the experimental groups. Image analysis showed that the expression of MIP-1 α protein in ECs was 1.9-fold B, 1.4-fold in group A and 1.3-fold in group C as much as that in the control group. The analysis of variance proved that there were significant differences between the experimental groups and the control group ($F = 68.60, P < 0.01$), and there were also significant differences among group A, B and C which were proved by Q test ($P < 0.05$). **Conclusion** Lipid peroxidation injury may play an important role in recruitment of monocytes into intima in atherogenesis through inducing ECs to produce increased MIP-1 α .

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(项目编号 39730220)

[作者简介] 杨丽敏, 女, 1973 年出生, 河南洛阳人, 病理学博士。邓仲端, 男, 1927 年出生, 广西南宁人, 教授, 博士研究生导师。

外周血单核细胞粘附于内皮并迁入内皮下间隙是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的早期变化。巨噬细胞炎性蛋白 1 α (macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α)是一种主要对巨噬细胞和 T 淋巴细胞具有趋化作用的趋化因子^[1],它在动脉粥样硬化发病过程中是否发挥作用,目前研究较少。有研究表明,血管内皮细胞(endothelial cells, ECs)受理化因素损伤刺激后,某些趋化因子分泌增加,与 As 早期单核细胞的迁入有关^[2]。本课题拟用联胺诱导培养的内皮细胞脂质过氧化损伤,为观察 MIP-1 α 在单核细胞迁入内膜过程中的作用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 人脐静脉内皮细胞培养和分组

将传代培养的人脐静脉内皮细胞(内皮细胞株 V304,武汉大学中国典型物保藏中心提供)培养于含 10%小牛血清(Gibco 公司)的 DMEM 培养基(Gibco 公司)。用 0.1%的胰蛋白酶消化传代。ECs 胞浆出现亮绿色荧光。待细胞生长至汇合状态时,换用 D8900 培养基(Gibco 公司)培养 12 h,然后随机分成实验组和对照组,前者分别加入含 1、5 及 10 μ mol/L 联胺的 D8900 培养基,对照组不加联胺。培养 4 h 后,按不同检测方法,分别收集和保存实验材料。

1.2 脂质过氧化硫代巴比妥酸荧光微量测定法

将细胞按 10^5 /孔接种入 96 孔板,以 D8900 培养基培养 24 h,加联胺 4 h 后测定丙二醛(malondialdehyde, MDA)。参照 Tanizawa 等^[3]方法,每孔细胞加入 3.0% SDS 0.2 mL,充分混匀,取样品 0.2 mL,加入 2.0 mol/L 乙酸缓冲液(pH 3.5)及 0.8% 硫代巴比妥酸各 1.5 mL,加三蒸水至 5 mL,95 $^{\circ}$ C 温育 60 min,冷却 5 min,加 0.2 mol/L 盐酸 1 mL,加正丁醇:吡啶(15:1) 5 mL 充分混匀,离心,3000 r/min 15 min。取上清进行荧光测定(EX: 515 nm; Em: 553 nm),同步培养的另一部分细胞用 Lowry 等^[4]法测定每孔细胞总蛋白,对各组相对于细胞总蛋白的丙二醛含量进行方差分析和组间 q 检验。

1.3 反转录多聚酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)

按 1.1 所述加药处理细胞后,用一步法提取各组细胞总 RNA。取每组总 RNA 各 1 μ g,逆转录合成 cDNA。取该产物 2 μ L 进行 PCR 循环(94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,58 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,共 30 个循环,末次延伸为 72 $^{\circ}$ C 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存)。PCR 反应体系总体积 5 μ L,含 1 \times PCR buffer、1.5 mmol/L MgCl₂、0.2

mmol/L dNTP、引物各 20 pmol/L 及 Taq 酶 2 u。MIP-1 α 的引物序列为:正链 5' - CTGCCCTTGCTGTC-CTCCTCTG - 3',负链 5' - CTGCCGGCTTCGCT-TGGTTA - 3',PCR 扩增产物长度为 197 bp。内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的引物序列为:正链 5' - GGGGAGCCAAAAGGGTCATCATCT - 3',负链 5' - GAGGGGCCATCCACAGTCTTCT - 3',PCR 扩增产物长度为 235 bp(美国 Gibco BRL 公司)。为了控制 PCR 反应过程中基因组 DNA 污染,所设计的正链、负链引物都跨越至少一个内含子。反应完毕,取反应产物 10 μ L 进行浓度为 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色显示,紫外线拍照, SQ9636 型扫描系统进行扫描,图像分析系统检测各组目的基因及其 GAPDH 基因的积分吸光度值,计算二者的比值即相对积分吸光度(A)值。以此比值作为各组 mRNA 的相对表达量。

1.4 免疫细胞化学

培养于盖玻片上的各组 ECs 加药处理,PBS 液洗两次,用乙醇:丙酮混合液(1:1)室温固定细胞 20 min,自然风干后,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。用 MIP-1 α 多克隆抗体(Sigma 公司)和免疫细胞化学检测试剂盒(博士德公司)进行免疫染色后,在 200 倍视野下,每组随机选取 30 个 ECs, TJTY-300 型全自动图像分析系统测定细胞内显色颗粒的平均吸光度(A)值,SAS 软件对各组数据进行方差分析和组间 q 检验。

2 结果

2.1 内皮细胞脂质过氧化水平

从表 1(Table 1)可见,1、5 和 10 μ mol/L 联胺刺激后的细胞 MDA 含量分别为对照组的 2.0、5.3 和 8.6,方差分析显示实验组与对照组间差异有显著性($F = 138.64, P < 0.01$),各组间两两比较差异也有显著性($P < 0.05$)。

表 1. 脂质过氧化硫代巴比妥酸荧光微量测定结果

Table 1. The result of micro-determination of lipoperoxide in the ECs by thiobarbituric acid fluorophotometry ($\bar{x} \pm s$)

Groups	MDA ($\times 10^{-5}$ mmol/ μ g protein)
Control	3.94 \pm 1.02
1 μ mol/L diamide	8.02 \pm 1.73 ^a
5 μ mol/L diamide	20.71 \pm 2.69 ^{ab}
10 μ mol/L diamide	33.71 \pm 7.58 ^{abc}

a: $P < 0.01$, compared with the control; b: $P < 0.05$, compared with 1 μ mol/L diamide; c: $P < 0.05$, compared with 5 μ mol/L diamide.

2.2 内皮细胞巨噬细胞炎性蛋白 1 α mRNA 表达

实验组和对照组 ECs 的 MIP-1 α mRNA 经反转录并扩增后,电泳显示不同的荧光强度。实验组荧光强度高于对照组(图 1, Figure 1)。图像分析结果显示,5 μ mol/L 联胺刺激组细胞 MIP-1 α mRNA 表达水平最高(A 值 0.7156),是对照组(A 值 0.1194)的 6 倍,1 μ mol/L 和 10 μ mol/L 联胺刺激组分别是对照组的 4 倍(A 值 0.4797)和 3.5 倍(A 值 0.4128)。

2.3 内皮细胞巨噬细胞炎性蛋白 1 α 蛋白表达

巨噬细胞炎性蛋白 1 α 在实验组和对照组均有表达,主要为分布于胞浆核周区的棕黄色颗粒。实验组 MIP-1 α 的阳性颗粒较对照组多,颜色加深(图 2, Figure 2)。图像分析显示,加不同浓度联胺后各组 ECs MIP-1 α 蛋白表达水平均较对照组高,尤以 5 μ mol/L 浓度时最为显著,是对照组的 1.9 倍,1 和 10 μ mol/L 浓度时分别是对照组的 1.4 倍和 1.3 倍。方差分析结果显示,实验组和对照组差异有显著性

($F = 68.60, P < 0.01$), 各组间两两比较差异亦有显著性($P < 0.05$) (表 2, Table 2), 与 RT-PCR 显示的联胺作用后 MIP-1 α mRNA 表达水平的变化相符合。

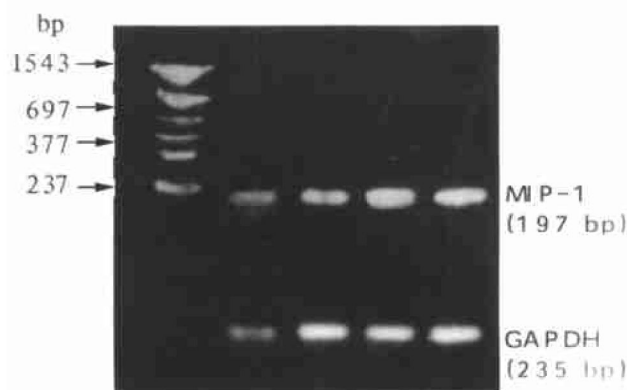


图 1. 内皮细胞 MIP-1 α mRNA RT-PCR 检测结果

Figure 1. The expression of MIP-1 α mRNA in ECs determined by RT-PCR. A: PCR Marker; B: the control; C: 1 μ mol/L diamide; D: 5 μ mol/L diamide; E: 10 μ mol/L diamide.

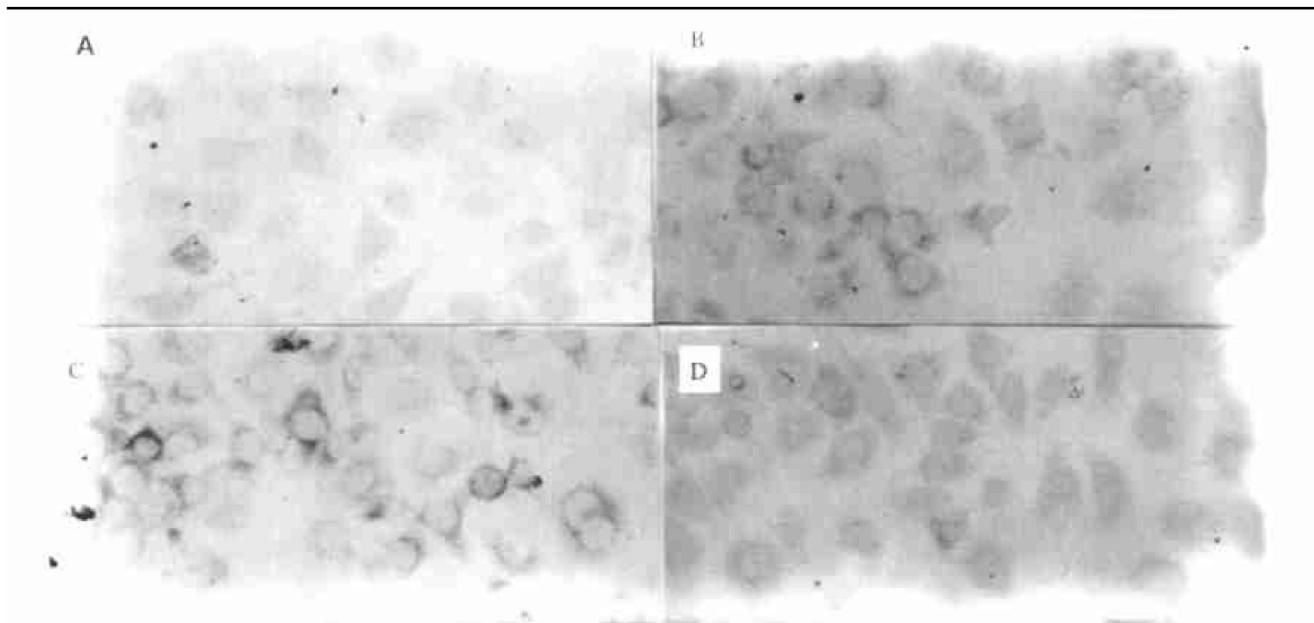


图 2. 免疫细胞化学内皮细胞巨噬细胞炎性蛋白-1 α 蛋白的表达

Figure 2. The expression of MIP-1 α protein in ECs. A: the control; B: 1 μ mol/L diamide; C: 5 μ mol/L diamide; D: 10 μ mol/L diamide.

表 2. 各组内皮细胞 MIP-1 α 蛋白表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. The comparison of the expression of MIP-1 α protein in ECs

Groups	A
Control	0.0476 \pm 0.0105
1 μ mol/L diamide	0.0667 \pm 0.0178 ^a
5 μ mol/L diamide	0.0883 \pm 0.0073 ^{ab}
10 μ mol/L diamide	0.0597 \pm 0.0057 ^{abc}

a: $P < 0.01$, compared with the control; b: $P < 0.01$, compared with 1 μ mol/L diamide; c: $P < 0.01$, compared with 5 μ mol/L diamide.

3 讨论

近年来, As 发病机制的炎症观点又重新被强调。内皮细胞极易受到血液及其周围有害因素如高脂血症、脂质过氧化、细菌毒素的影响而发生机能和结构改变, 各种有害因子除引起内皮细胞损伤外, 更重要的是还能刺激其合成和分泌一些细胞因子, 如粘附分子和趋化因子, 招引外周血单核细胞粘附于内皮, 并向内皮下间隙迁移^[21]。洪伟等报道, 联胺可诱导内皮细胞脂质过氧化损伤, 进而引起单核细胞粘附于内皮增多^[5], 表明脂质过氧化可诱导内皮细

胞产生粘附分子和趋化因子。通过硫代巴比妥酸荧光微量测定法测定样品中的丙二醛含量, 我们证明了联胺能引起内皮细胞脂质过氧化损伤, 且损伤的程度随联胺浓度的增高而加重, 与我们过去的报道一致^[6, 7]。

巨噬细胞炎性蛋白- 1 属于 C- C 型趋化因子家族, 有 MIP- 1 α 和 MIP- 1 β 两种^[8], 前者对单核细胞的趋化作用大于后者^[9]。据报道, 在革兰氏阳性细菌感染的脑膜炎和伤口炎症部位均存在 MIP- 1^[10, 11]。MIP- 1 对许多正常和转化的细胞具有促炎症性、趋化活性及生长调节特性^[12, 13], 且 MIP- 1 α 的促炎症效应比 MIP- 1 β 强^[14]。已经证明, 单核/巨噬细胞、T 淋巴细胞、肥大细胞、成纤维细胞、肺泡 Ⅱ型细胞、支气管纤毛上皮细胞和肺腺癌细胞均可产生 MIP- 1 α ^[15]。然而, 内皮细胞能否产生 MIP- 1 α , 以及 MIP- 1 α 是否在 As 发生过程中发挥作用, 目前报道较少。我们过去用斑点杂交和夹心 ELISA 证明, 联胺可导致内皮细胞脂质过氧化损伤而诱导其表达高水平的单核细胞趋化蛋白- 1 (monocyte chemoattractant protein- 1, MCP- 1) mRNA 和蛋白, 并与联胺的作用时间和浓度呈正相关^[6]; 同时, 核酸原位杂交和斑点杂交证明, 联胺可诱导内皮细胞表达血管细胞粘附分子- 1 和 MIP- 1 增强^[7]。本次试验用 RT- PCR 和免疫组化也证明, 培养的内皮细胞可产生 MIP- 1 α mRNA 和蛋白, 且受到联胺刺激后 MIP- 1 α 表达增强。总之, 我们用不同的实验方法均证明, 内皮细胞的脂质过氧化损伤导致其表达高水平的 MIP- 1 α 、MCP- 1 及血管细胞粘附分子- 1, 可能在 As 病变的形成中起重要作用。

参考文献

- [1] Oh KO, Zhou Z, Kim KK, et al. Identification of cell surface receptors for murine macrophage inflammatory protein 1 α [J]. *J Immunol*, 1991, **147**(9): 2 978- 982
- [2] Ross R. Atherosclerosis- An inflammatory disease [J]. *New Engl J Med*, 1999, **340**(2): 115- 126
- [3] Tanizawa H, Sazuka Y, Takino Y, et al. Micro- determination of lipoperoxide in the mouse myocardium by thiobarbituric acid fluorophotometry [J]. *Chem Pharm Bull*, 1981, **29**(10): 2 910- 914
- [4] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265- 275
- [5] 洪伟, 陈铁镇. 内皮细胞脂质过氧化损伤与单核细胞内皮下穿入 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1997, **23**(3): 191- 197
- [6] 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 α [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1997, **5**(4): 291- 294
- [7] 夏春枝, 邓仲端. 脂质过氧化诱导培养的内皮细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1 α 和血管细胞粘附分子 1 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8**(3): 202- 204
- [8] Smith RE, Strieter RM, Phan SH, et al. Production and function of murine macrophage inflammatory protein- 1 α in bleomycin- induced lung injury [J]. *J Immunol*, 1994, **153**(10): 4 704- 712
- [9] Uguccioni M, D'Apuzzo M, Loetscher M, et al. Action of chemotactic cytokines MCP- 1, MCP- 2, MCP- 3, RANTES, MIP- 1 α and MIP- 1 β on human monocytes [J]. *Eur J Immunol*, 1995, **25**(1): 64- 68
- [10] Saukkonen K, Sande S, Cioffe C, et al. The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram- positive meningitis [J]. *J Exp Med*, 1990, **171**(2): 439- 448
- [11] Fahey TJ, Sherry B, Tracey KJ, et al. Cytokine production in a model of wound healing: the appearance of MIP- 1, MIP- 2, cachectin/TNF and IL- 1 [J]. *Cytokine*, 1990, **2**(2): 92- 99
- [12] Wolpe SD, Cerami A. Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines [J]. *FASTBJ*, 1989, **3**(14): 2 565- 573
- [13] Stoeckle MY, Barker KA. Two burgeoning families of platelet factor 4- related proteins: mediators of the inflammatory response [J]. *New Biol*, 1990, **2**(4): 313- 323
- [14] Standiford TJ, Rolfe MW, Kunkel SL, et al. Macrophage inflammatory proteins expression in interstitial lung disease [J]. *J Immunol*, 1993, **151**(5): 2 852- 863
- [15] Konishi T, Okabe H, Katoh H, et al. Macrophage inflammatory protein alpha expression in non- neoplastic and neoplastic lung tissue [J]. *Virchows Arch*, 1996, **428**(2): 107- 111

(2000- 08- 07 收到, 2000- 12- 30 修回)

(此文编辑 朱雯霞)