

[文章编号] 1007- 3949(2001) - 02- 0115- 04

• 实验研究 •

普罗布考和抗氧化维生素不影响体外实验条件下内皮细胞的白细胞粘附

黄 虔, Gröfe M¹, Grafe K¹, Fleck E¹

(暨南大学医学院附属第一医院心内科, 广州 510630;

1. Department of Internal Medicine Cardiology, German Heart Institute Berlin, Berlin 13353, Germany)

[主题词] 内皮细胞; 粘附分子; 抗氧化剂; 核转录因子- κ B

[摘要] 为探讨预防动脉粥样硬化的药物普罗布考、维生素 C 和维生素 E 是否抑制内皮细胞表面粘附分子表达和白细胞-内皮细胞的粘附, 以及这种抑制是否通过影响核因子- κ B 的活性来实现的, 在液体流动小室中进行细胞粘附实验; 用 ELISA 方法测定内皮细胞粘附分子 E- 选择素的表达; 用电泳迁移率分析测定内皮细胞核因子- κ B 的活性。经肿瘤坏死因子 α 刺激的内皮细胞核因子- κ B 活性增加, 粘附分子 E- 选择素的表达上调(是基础水平的 3.5 倍), 其表面 HL60 细胞的粘附增加(是基础水平的 4~ 26 倍), 而抗氧化剂 PDTC 使所有这些变化都受到抑制。PDTC 浓度为 18 μ mol/L 时对粘附分子 E- 选择素的表达呈最大半抑制; PDTC 浓度为 52 μ mol/L 时对内皮细胞表面 HL60 细胞的粘附呈最大半抑制。普罗布考、维生素 C 和维生素 E 对肿瘤坏死因子 α 诱导的粘附分子表达和 HL60 细胞与内皮细胞的粘附没有作用; 对核因子- κ B 的活性没有影响。临床上常用的这三种抗氧化剂并未影响作为动脉粥样硬化始动机制之一的 E- 选择素介导的白细胞-内皮细胞粘附水平。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Probucol and Antioxidative Vitamins Showed no Effect on Leukocytes- Endothelial Cells Adhesion in Vitro

HUANG Qian, GRÖFE Micheal, GRAF Kristof, and FLECK Eckart

(Department of Cardiology, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510630, China)

MeSH Endothelium; Adhesion Molecules; Antioxidants; NF- κ B

ABSTRACT **Aim** To investigate whether antioxidants probucol, vitamin E and vitamin C modulate expression of endothelial cell adhesion molecules through regulating NF- κ B activation. **Methods** The adhesion of HL60 cell on endothelial cells was measured with adhesion assay in a flow chamber. The effects of the antioxidative substances probucol, vitamin E and vitamin C on the expression of endothelial cell adhesion molecules were measured with cell-ELISA. The activation of NF- κ B in endothelial cells was investigated in a gel shift assay. **Results** In TNF α -activated HUVEC, an increase in p65 and p50, a significantly increased expression of E-selectin (3.5 times), and a significantly increased HL60 cell adhesion to HUVECs (4~ 26 times) were detected. PDTC inhibited these increases. The half-maximal inhibition of PDTC on E-selectin expression and adhesion of HL60 to HUVEC induced by TNF α was at 18 μ mol/L and 52 μ mol/L, respectively. Probucol, vitamin E and vitamin C showed no effect on TNF α -induced E-selectin expression in endothelial cells, no influence on HL60-endothelial cell adhesion as well as the TNF α -induced activation of NF- κ B in endothelial cells. **Conclusions** These antioxidants could not inhibit adhesion molecule expression.

普罗布考(probucol)、维生素 C 和维生素 E 是临床上常用的预防动脉粥样硬化的药物^[1], 一般认为, 他们的抗动脉粥样硬化作用源于他们清除氧自由基的能力。氧自由基是炎症反应、动脉粥样硬化和再灌注损伤的致病因素, 这些病变早期的共同特征是

内皮细胞与白细胞粘附增加^[2]。核因子(nuclear factor, NF)- κ B 是炎症反应的重要介质, 在内皮细胞表面的粘附分子表达过程中起着重要作用。近来发现许多抗氧化剂和金属离子螯合剂能有效抑制 NF- κ B 的活性^[3], 因此推测氧自由基与 NF- κ B 活性有关。特异性地抑制 NF- κ B 的活性也许是防治动脉粥样硬化的潜在手段。然而, 迄今尚未阐明现已广泛使用的抗氧化剂是否抑制 NF- κ B 的活性和细

[作者简介] 黄虔, 男, 1956 年出生, 医学博士, 副主任医师, 副教授, 硕士生导师。在研项目: 粘附分子在动脉粥样硬化发病学中的作用; ④抗氧化剂对粘附分子表达的影响; ④心肌存活影像学评价。

胞表面粘附分子表达, 本文就此进行了研究。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人脐带静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)按常规方法培养。新生儿脐带取自 Virchow 医院妇产科, 分离脐静脉内皮细胞, 将细胞用内皮细胞培养液(M199 加入 20% 牛血清、100 mg/L 青霉素、100 mg/L 链霉素、10 μg/L 内皮细胞生长因子和 2 mmol/L L- 谷氨酸)在 37℃二氧化碳培养箱中培养。T75 组织培养瓶使用前以 2% 明胶包被瓶底。HL60 细胞是一种路易斯寡糖(sialylated lewis x, sLex)高水平表达的细胞系。在含 10% 小牛血清、抗生素、2 mmol/L L- 谷氨酸的 RPMI 1640 培养液中培养(置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中)。

1.2 受试药物

本研究的受试药物有普罗布考(probucol)、维生素 C 和维生素 E, 同时以已经证实对细胞粘附分子表达和 NF-κB 活性具有明显抑制作用的抗氧化剂吡咯烷二巯基氨基甲酸盐(pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)作为阳性对照药物。普罗布考和维生素 E 用二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO), 维生素 C 和 PDTC 用蒸馏水溶解至所需的浓度, 各种药物受试浓度梯度分别为: 10⁻⁷、3 × 10⁻⁶、10⁻⁶、3 × 10⁻⁵、10⁻⁵、3 × 10⁻⁴和 10⁻⁴ mol/L。

1.3 ELISA 方法

将传了两代的 HUVEC 种到经明胶包被的 96 孔组织培养板上, 待细胞融合后先用抗氧化药孵育 15 min, 然后加 TNFα (5 × 10⁸ u/L) 刺激 5 h。每次实验都设未经 TNFα 刺激的内皮细胞为阴性对照。5 h 后用磷酸缓冲液冲洗内皮细胞, 加入抗 E- 选择素的单克隆抗体于 37℃孵育 30 min。再用 PBS 冲洗两次后加入碱性磷酸酶标记的抗鼠抗体于 37℃孵育 30 min。用磷酸缓冲液洗涤 3 次后加入 100 μL p- 磷酸硝基苯。45 min 后在 ELISA 读数仪上测定吸收率。

1.4 细胞粘附实验

细胞粘附实验在一种液体流动小室中进行^[4]。液体流动小室是一种平行板状结构, 其管道由入口至出口呈双曲线状增宽, 在恒流条件下管壁切变力是管道宽度的函数, 提供一种接近生理的液体流动条件。液体流动小室安放在 Zeiss 显微镜上, 与灌注系统相连, 流速由输液泵控制。整个系统在实验过程中保持 37℃。

将传了两代的 HUVEC 种在经过纤维素处理的

载玻片上培养至完全融合。经 PDTC、probucol、维生素 C 和维生素 E(浓度从 3 × 10⁻⁴ 到 10⁻⁷ mol/L) 处理 15 min 后, 用肿瘤坏死因子(TNFα) 刺激 4 h。将种有 HUVEC 的载玻片安放在流体小室内, 用加有 0.1% 牛血清蛋白、10 mmol/L Hepes 缓冲液的 M199 培养液持续灌注。从小室入口加入 100 μL HL60 细胞(10⁹/L), 任其粘附, 5 min 后计数固定粘附在内皮细胞上的白细胞个数。

1.5 电泳迁移率分析

1.5.1 细胞核蛋白提取 按 Dignam 方法^[5]制备核提取物。融合的 HUVEC 加抗氧化剂孵育 15 min 后, 以 TNFα 刺激 1 h。刺激后细胞以酶消化法收获, 低温离心沉淀(1 000 g, 10 min, 4℃), 用冰冷 PBS 溶液清洗, 然后加入 400 μL 的匀浆缓冲液(0.5 mmol/L PMSF、pH 7.8 10 mmol/L Hepes、1.5 mmol/L Mg Cl₂、10 mmol/L KCl 和 0.5 mmol/L DTT) 冰浴 20 min, 再加入 25 μL 10% P40 溶液后混匀, 1 000 g 离心 5 min 后去除上清。在以上离心沉淀物中加入 100 μL 核提取缓冲液(pH 7.8 20 mmol/L Hepes、0.42 mmol/L NaCl₂、1.5 mmol/L MgCl₂、0.2 mmol/L EDTA、0.5 mmol/L DTT、0.5 mmol/L PMSF 和 25% glycerol), 4℃冰浴 30 min, 16 000 g 离心 20 min, 取上清即为核蛋白溶液。采用 Bradford 方法确定蛋白浓度。

1.5.2 结合反应 用放射性 γ-³²P-ATP 标记包含 NF-κB 顺序的寡核苷酸片段(上游引物的核苷酸序列为 5' - AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C- 3', 下游引物与上游引物互补, 核苷酸序列为 3' - TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G- 5')。探针以常规方法掺入 γ-³²P-ATP 标记, 终浓度为 3 μmol/L。根据蛋白浓度, 在同一实验中取等量的核蛋白样品。2 μL 反应体系中包括核蛋白 5 μg 和结合缓冲液(pH 7.5 10 mmol/L Tris-HCl、50 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L DTT、5 mmol/L EDTA、0.25 mmol/L MgCl₂、3 μmol/L poly(dI-dC) 和 4% 甘油)。以上反应体系于 4℃冰浴 10 min 后加入同位素标记的寡核苷酸探针 2 μL(0.3~0.6 pmol), 室温作用 15 min 后上样。在 4% 不饱和聚丙烯酰胺凝胶中 160 V、4℃条件下电泳 2 h。然后让凝胶干燥, 放射自显影。

1.6 统计处理

计数资料以平均数 ± 标准差表示, 均数差异显著性用方差分析和 t 检验处理。n 表示实验次数。最大半抑制浓度用非线性回归计算得出。

2 结果

2.1 药物对 E- 选择素表达的影响

未经 TNF α 刺激的内皮细胞有低水平的 E- 选择素表达(OD 值 0.27 ± 0.06 , 对照本底的 OD 值 0.16 ± 0.04 , $P < 0.01$)。用 TNF α 刺激人脐带静脉内皮细胞 5 h 后 E- 选择素的表达明显增强, 是基础水平的 3.5 倍。为清楚显示各种抗氧化药对粘附分子表达的调节作用, 将受 TNF α 刺激的内皮细胞表达粘附分子水平作为 100%, 来计算其余各组的粘附分子水平。从图 1(Figure 1) 可见, 所有抗氧化药在 10^{-7} mol/L 至 10^{-4} mol/L 浓度范围内, PDTC 对 E- 选择素的表达显示出剂量依赖性抑制作用, 最大半抑制(half maximal inhibition) 剂量是 18 μ mol/L。ProbucoI、维生素 C 和维生素 E 对 E- 选择素的表达没有抑制作用。

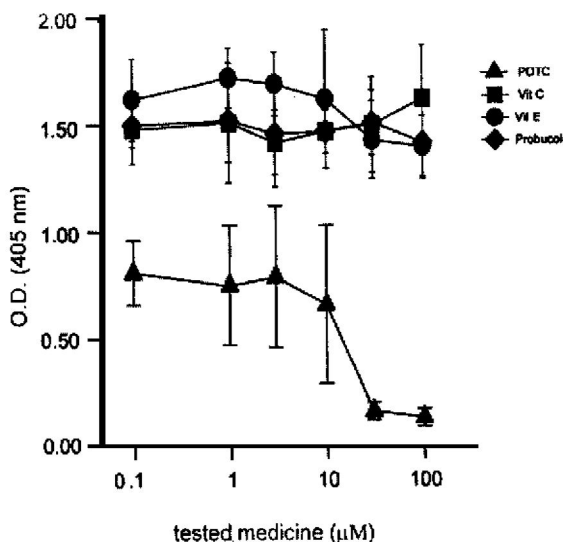


图 1. 抗氧化剂对 E- 选择素表达的影响
Figure 1. The effect of antioxidants on E- selectin expression

2.2 药物对 HL60 细胞与内皮细胞粘附的影响

在所有流体小室实验中, 固定粘附的细胞数随切变力的增加而减少。在对未经 TNF α 刺激的内皮细胞所做的实验中, 在切变力是 2.2 dyne/cm^2 时, HL60 固定粘附的数目为 3 ± 1 个/HP, 在切变力是 0.6 dyne/cm^2 时, 固定粘附的细胞数目为 160 ± 14 个/HP。将 HUVEC 与 TNF α 一起孵育 5 h, 可明显增加 HUVEC 上 HL60 粘附的数量, 在高切变区(切变力 $> 2.0 \text{ dyne/cm}^2$) 为 79 ± 6 个/HP, 在低切变区(切变力 $< 1 \text{ dyne/cm}^2$) 为 655 ± 30 个/HP, 分别是基础水平的 4 倍和 26 倍。PDTC 对 HL60 与 HUVEC 粘附有很强的抑制作用, 最大半抑制浓度是 52 μ mol/L。ProbucoI、维生素 C 和维生素 E 对 HL60 与 HUVEC 粘附没有抑制作用(图 2, Figure 2)。

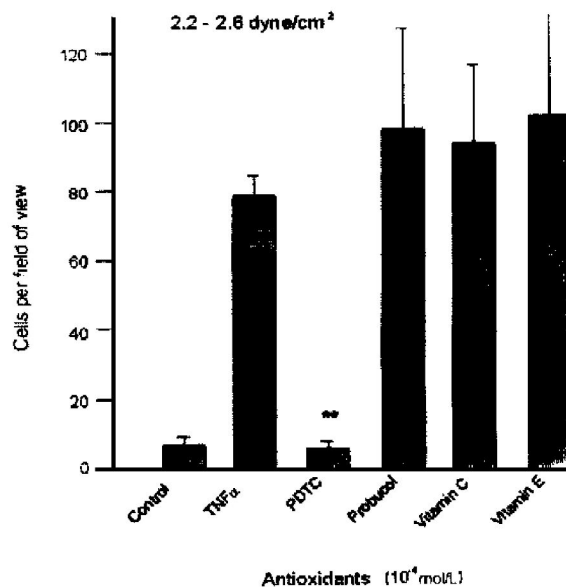


图 2. 抗氧化剂对 HL60 细胞与内皮细胞粘附的影响
Figure 2. The effect of antioxidants on HL60- HUVEC adhesion

2.3 药物对核因子- κ B 活性的影响

内皮细胞 NF- κ B 的活性是用电泳迁移率分析测定的。在未经 TNF α 刺激的 HUVEC 很难测得 NF- κ B 特异性的 DNA- 蛋白质复合物(P65 和 P50)。HUVEC 经 TNF α 处理 1 h 后, 测得的 P65 和 P50 明显增加。经 PDTC 预处理后的 HUVEC, TNF α 刺激 NF- κ B 的活性受到明显抑制。ProbucoI、维生素 C 和维生素 E 对经 TNF α 处理的内皮细胞 NF- κ B 的活性没有影响(图 3, Figure 3)。

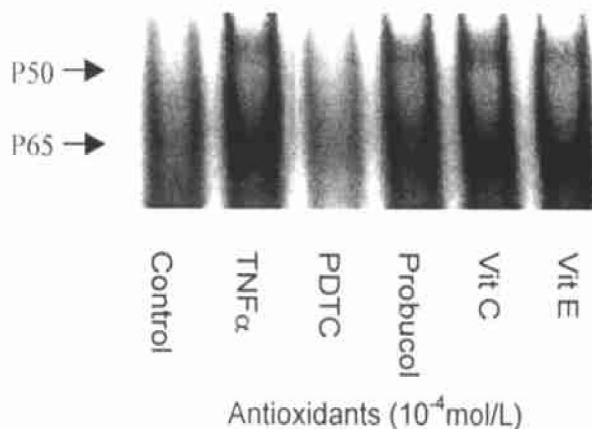


图 3. 抗氧化剂对核因子- κ B 活性的影响
Figure 3. The effect of antioxidants on NF- κ B activation

3 讨论

本研究证实, 经 TNF α 刺激的 HUVEC 其 NF- κ B 活性增加, 粘附分子 E- 选择素的表达上调, 其表面

HL60 细胞的粘附增加, 而 PDTC 使所有这些变化都受到抑制。一般认为, PDTC 抑制 NF- κ B 的激活与其抗氧化特性有关。提示 ROI (reactive oxygen intermediate) 可能参与细胞因子例如 TNF α 的信号转导过程。本文结果显示, 同样具有抗氧化活性的 ProbucoI、维生素 C 和维生素 E 对 NF- κ B 的活性却没有影响。

为了评价抗氧化剂对白细胞-内皮细胞粘附的影响, 我们在接近生理血流条件下做了细胞粘附实验。条件设定在流室入口处的切变力为 2.6 dyne/cm², 出口处的切变力为 0.6 dyne/cm², 因而才可能测得 E-选择素依赖的白细胞滚动(发生在切变力大约 1 dyne/cm²) 和结合素依赖的白细胞固定粘附(< 1 dyne/cm²)。结果表明 PDTC 明显抑制 HL60 与内皮细胞粘附, ProbucoI、维生素 C 和维生素 E 则没有抑制作用。

细胞 ELISA 方法在本研究中用于测定细胞粘附分子的表达。作为阳性对照的 PDTC 能有效抑制肿瘤坏死因子刺激的内皮细胞表面粘附分子表达的上调, 与在细胞粘附实验中观察到的一样, ProbucoI、维生素 C 和维生素 E 对细胞粘附分子的表达也没有抑制作用。

ProbucoI、维生素 C 和维生素 E 作为预防动脉粥样硬化的药物已广泛应用于临床^[6,7]。动物实验肯定 ProbucoI 抑制动脉粥样硬化的发生^[8], 联合使用维生素 E 和维生素 C 增加血管损伤后的管腔内径^[9], 临床研究已证实 ProbucoI 能够预防 PTCA 术后的再狭窄^[10]。目前认为 ProbucoI 的抗氧化作用比其降血脂作用在预防动脉粥样硬化方面更为重要。对于有关作用机理的解释还有争论。有人认为活性氧是平滑肌细胞的有丝分裂原, 在再狭窄过程中起作用, 抗氧化剂对抗这一过程, 因此, 抗氧化剂的潜在治疗作用来自于它们的抗氧化特性^[11]。也有人推测, 这些“抗氧化剂”存在着与抗氧化作用无关的自身固有的独特作用机制^[12]。

本研究并未显示出 ProbucoI、维生素 C 和维生素 E 具有 PDTC 那样的对细胞粘附分子表达和 NF- κ B 活性的抑制作用, 说明尽管内皮细胞表面的粘附分子表达在动脉粥样硬化的发病学上起重要作用,

可 ProbucoI、维生素 C 和维生素 E 预防动脉粥样硬化并非通过抑制粘附分子表达, 与它们的抗氧化特性也无关。

参考文献

- [1] Gersh BJ, Braunwald E, Rutherford JD. Chronic coronary artery disease [M]. In: Braunwald E. *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*. 5th ed, Philadelphia: Saunders, 1997; 1 289 - 345
- [2] Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis [J]. *Science*, 1991, **251**: 788- 791
- [3] Schreck R, Meier B, Mannel DN, et al. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells [J]. *J Exp Med*, 1992, **175**: 1 181- 194
- [4] Gröfe M, Auch-Schwelk W, Graf K, et al. Isolation and characterization of macrovascular and microvascular endothelial cells from human hearts [J]. *Am J Physiol*, 1994, **267**: H2 138- 148
- [5] Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei [J]. *Nucleic Acids Res*, 1983, **11**: 1 475- 489
- [6] Stampfer MJ, Rimm EB. Epidemiologic evidence for vitamin E in prevention of cardiovascular disease [J]. *Am J Clin Nutr*, 1995, **62**: S1 365- 369
- [7] Retsky KL, Frei B. Vitamin C prevents metal ion- dependent initiation and propagation of lipid peroxidation in human low- density lipoprotein [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1257**: 279- 287
- [8] Kita T, Nagano Y, Yokode M, et al. Prevention of atherosclerotic progression in Watanabe rabbits by probucol [J]. *Am J Cardiol*, 1988, **62**: 13B- 19B
- [9] Nunes GL, Sgoutas DS, Redden RA, et al. Combination of vitamins C and E alters the response to coronary balloon injury in the pig [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**: 156- 165
- [10] Rodes J, Cote G, Lesperance J, et al. Prevention of restenosis after angioplasty in small coronary arteries with probucol [J]. *Circulation*, 1998, **97**: 429- 436
- [11] Herbert JM, Bono F, Savi P. The mitogenic effect of H₂O₂ for vascular smooth muscle cells is mediated by an increase of the affinity of basic fibroblast growth factor for its receptor [J]. *FEBS Letters*, 1996, **395**: 43- 47
- [12] Frishman WH, Chiu R, Landzberg BR, et al. Medical therapies for the prevention of restenosis after percutaneous coronary interventions [J]. *Curr Prob Cardiol*, 1998, **23**: 536- 635

(此文 2000- 08- 18 收到, 2001- 01- 30 修回)

(此文编辑 朱雯霞)