

脂质过氧化诱导培养的内皮细胞产生单核细胞趋化因子 RANTES

赵霞, 祝学卫, 杨丽敏, 邓仲端, 朱大和

(华中科技大学同济医学院病理学教研室, 武汉 430030)

[关键词] 脂质过氧化; RANTES; 内皮, 血管; 单核细胞; 动脉粥样硬化

[摘要] 为探讨脂质过氧化损伤是否诱导内皮细胞产生单核细胞趋化因子 RANTES, 使培养的人脐静脉内皮细胞暴露于 5 $\mu\text{mol/L}$ 联胺后收取其条件培养基。继之, 将其放在截留分子质量分别为 3.5 kDa(外层)和 10 kDa(内层)的双层透析袋中, 间层注入适量的 0.01 mol/L PBS, 再将透析袋悬在装有 PBS 的锥形瓶内进行透析。透析完毕, 取出间层液体, 即为分子质量为 3.5 ~ 10 kDa 的条件培养基, 其中含 RANTES。用微孔滤膜法进行单核细胞趋化实验, 并应用鼠抗人 RANTES 抗体, 以证明条件培养基中 RANTES 的趋化活性。结果发现, 经联胺刺激的条件培养基引起的单核细胞迁移距离 ($89.75 \pm 11.33 \mu\text{m}$) 明显大于不经联胺刺激的条件培养基 ($77.30 \pm 11.53 \mu\text{m}$) 和随机移动组 ($76.18 \pm 10.50 \mu\text{m}$)。方差分析显示, 组间差异有极显著性 ($F = 47.20, P < 0.01$)。加入鼠抗人 RANTES 抗体后, 单核细胞迁移距离明显缩短 ($F = 21.31, P < 0.01$)。结果提示, 从功能实验方面表明脂质过氧化损伤能诱导内皮细胞产生 RANTES 增强, 并可能在动脉粥样硬化病变的发生过程中起一定作用。

[中图分类号] R322.1, R392.12

[文献标识码] A

Lipid Peroxidation Induces Production of Monocyte Chemotactic Factor RANTES

ZHAO Xia, ZHU Xue-Wei, YANG Li-Min, DENG Zhong-Duan, and ZHU Da-He

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

MeSH Lipid Peroxidation; RANTES; Endothelium, Vascular; Monocyte; Atherosclerosis

ABSTRACT **Aim** To understand whether lipid peroxidation injury to endothelial cells (ECs) induces the production of monocyte chemotactic factor RANTES. **Methods** After a four hour exposure of the cultured human umbilical vein ECs to 5 $\mu\text{mol/L}$ diamide, the conditioned medium (CM) was collected. To obtain a conditioned medium containing RANTES (MW 8 kDa), the above CM was put into the double layer dialysis molecular porous membrane tubings (Spectrum Lab. Inc.) with the molecular weight cut off at 10 kDa (inner layer) and 3.5 kDa (outer layer) respectively. Appropriate amount of 0.01 mol/L PBS was injected into the interspace between the two membranes. The whole set of the membrane tubings was suspended in a pyramid flask containing PBS, and then the samples were dialysed against PBS. Finally, a conditioned medium with MW of 3.5-10 kDa was taken out from the interspace between the two membranes. The chemotactic activity of this conditioned medium for monocytes was tested by micropore filter method using a modified Boyden chamber. For antibody inhibition studies, the conditioned medium was incubated with anti-RANTES antibody and assayed again. **Results** The monocyte migration distance induced by diamide-CM group ($89.75 \pm 11.33 \mu\text{m}$) is markedly longer than that of the nondiamide-CM group ($77.30 \pm 11.53 \mu\text{m}$) and that of the random migration group ($76.18 \pm 10.50 \mu\text{m}$). Analysis of variance showed that there was a significant difference between groups ($F = 47.20, P < 0.01$). After the addition of anti-RANTES antibody, monocyte chemotactic activity was markedly inhibited ($F = 21.31, P < 0.01$). **Conclusion** On the basis of functional assay it suggests that lipid peroxidation injury might induce ECs to produce increased RANTES and may play an role in the recruitment of monocytes into the intima in atherogenesis.

外周血单核细胞(monocyte, MC) 迁入内皮下间

隙是动脉粥样硬化发生发展过程中的重要早期事件。此过程受多种因素, 主要是粘附分子(如 VCAM-1^[1])和趋化因子(如 MCP-1^[2], MIP-1 α ^[3])的影响。RANTES (regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted, 分子质量 8 kDa) 是近年发

[基金项目] 国家自然科学基金(项目编号 39730220)资助

[作者简介] 赵霞, 女, 1973 年 10 月出生, 河南开封人, 助教, 病理学硕士研究生。邓仲端, 男, 1927 年 10 月出生, 广西南宁人, 病理学教授, 博士研究生导师。

现的一种新型趋化因子,与 MCP-1 和 MIP-1 α 同属于 C-C 型趋化因子。它可诱导单核细胞,记忆型 T 淋巴细胞^[4],嗜酸性白细胞^[5]以及嗜碱性白细胞^[6]等的趋化运动。目前已有报道内皮细胞^[7]、平滑肌细胞、巨噬细胞和 T 淋巴细胞等多种细胞可表达 RANTES,但是这些研究多集中于免疫性疾病方面。RANTES 与动脉粥样硬化的关系如何?尚无定论。本实验旨在研究脂质过氧化损伤是否诱导内皮细胞产生 RANTES,以从蛋白水平及生物实验的角度阐明 RANTES 与动脉粥样硬化之间的关系。

1 材料和方法

1.1 内皮细胞条件培养基的制备

人脐静脉内皮细胞株(V304)购自武汉大学中国典型物保藏中心,用含 10% 新生小牛血清(Gibco 公司)的 DMEM(Gibco 公司),37℃,5% CO₂ 培养箱中静置培养,每两天换液一次。待细胞呈亚汇合状态时随机分为两组,对照组不加联胺,实验组换含 5 μ mol/L 联胺(diamide)的无血清 DME/F12 混合培养基(Sigma 公司)继续培养,4 h 后弃培养基,用 PBS 洗三次,再换 DME/F12 培养 20 h,分别收集各组培养基,即为条件培养基。过滤除菌,-20℃保存备用。

1.2 透析

将条件培养基置于截留分子质量为 10 kDa 的透析袋中,外层套以截留分子质量为 3.5 kDa 的透析袋,间层注入适量的 0.01 mol/L PBS(含 1×10^7 u/L 青霉素)。将此双层的透析袋悬于装有 PBS 的锥形瓶中进行透析,每 1~2 h 换 PBS 一次,共透析 24 h。将间层透析袋中的液体取出,即为分子质量为 3.5~10 kDa 的条件培养基。继用聚乙二醇浓缩,过滤除菌,4℃保存。

1.3 人血单核细胞的分离与鉴定

人血的分离与鉴定按文献[8]方法进行。简言之,用淋巴细胞分离液分离新鲜健康人血单个核细胞层,置于血浆包被的塑料平皿内,37℃温育后,弃未贴壁的细胞,收集贴壁的 MC,用 Giemsa 及非特异性酯酶染色鉴定,用 0.4% 台盼蓝拒染试验 MC 的存活率。

1.4 活化血清的制备

取三只正常成年家兔,经颈总动脉取血,4℃静置。待析出血清后,2 500~3 000 r/min 离心 5 min。吸取清亮血清并将之混合,然后加入 2 g 酵母提取物,37℃水浴 30 min,3 000 r/min 离心 5 min。吸取上清,56℃水浴 30 min,即为活化血清,含 C5a,对单

核细胞有很强的趋化活性。过滤除菌,-20℃保存备用,临用前用 DME/F12 稀释成 5%(V/V)。

1.5 趋化实验

1.5.1 实验方法 用改良的 Boyden 小室检测趋化物对 MC 的趋化活性。下室(0.2 mL)加实验液,上室加入 0.8 mL MC 悬液,上下室之间隔以硝酸纤维素微孔滤膜(Schleicher & Schuell 公司,孔径 8 μ m)。将小室置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中温育 90 min。取出滤膜,放入铜网架中,置于纯正丙醇中固定 6 s,苏木素染 4 min,流水冲洗;70% 酸性正丙醇 3 min,流水冲洗;显蓝 3 min(显蓝液: MgSO₄ 20 g, NaHCO₃ 2 g,加蒸馏水至 1 000 mL),流水冲洗;逐级正丙醇脱水;二甲苯透明,中性树胶封片。

1.5.2 趋化实验分组 (1)随机移动组:上下室均为非条件培养基(unconditioned media, UCM),无趋化活性,以观察 MC 的随机移动。(2)UCM+ 抗体组:上室为 UCM,下室在 UCM 中加鼠抗人 RANTES 抗体(Serotec 公司,1:50 稀释;购自晶美生物工程有限公司),以观察抗体有无趋化活性。(3)阳性对照组:上室为 UCM,下室为活化血清,含 C5a,对 MC 有强的趋化活性。(4)趋化运动 1 组:上室为 UCM,下室为对照组条件培养基,即未经联胺刺激的内皮细胞条件培养基(nondiamide conditioned medium, NDCM)。(5)趋化运动 2 组:上室为 UCM,下室为实验组条件培养基,即经联胺刺激的内皮细胞条件培养基(diamide conditioned medium, DCM)。(6)DCM+ 抗体组:上室为 UCM,下室在 DCM 中加鼠抗人 RANTES 抗体,以观察该抗体对 DCM 诱导的 MC 的趋化运动有无抑制作用,即 DCM 中是否存在 RANTES。为排除免疫复合物对实验的影响,将抗体加入 DCM 后,37℃温育 2 h,800 \times g 离心 1 min,以去除免疫复合物。(7)化学促动 1 组:上下室均为 NDCM,以观察不存在 NDCM 的浓度梯度时 MC 的趋化运动。(8)化学促动 2 组:上下室均为 DCM,以观察不存在 DCM 的浓度梯度时 MC 的趋化运动。

1.5.3 单核细胞移动距离的检测 在高倍显微镜下,用微调手轮调焦距对准滤膜表面。以此作为趋化运动的起点,向下转动手轮,可见细胞数目逐渐减少,至仅见 1~2 个单核细胞时,即为移动的终点。从微调手轮的刻度上直接读出起点至终点的微米数,即为 MC 迁移距离。每膜随机取 10 个视野,每组两张膜,实验重复三次,共得 60 个数据。

1.6 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SAS 软件进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 单核细胞的鉴定

台盼蓝拒染实验,单核细胞的存活率大于 90%。Giemsa 和非特异性酯酶染色,单核细胞纯度大于 80%。

2.2 趋化实验结果

下室为 DCM 的趋化 2 组引起的单核细胞迁移距离明显大于随机移动组和下室为 NDCM 的趋化 1 组,经方差分析表明,差异有极显著性($F=47.20, P < 0.01$)。而随机移动组和化学促动组之间,差异无显著性意义($P > 0.05$) (表 1, Table 1)。这说明联胺可刺激内皮细胞分泌单核细胞趋化因子。

表 1. 内皮细胞条件培养基所致的单核细胞迁移

Table 1. Monocyte migration induced by endothelial cell conditioned media ($n=60$)

Groups	Liquids of MC suspension in upper well	Experimental liquids in lower well	Migration distance(μm)
Random migration	UCM	UCM	76.2 ± 10.5^{ab}
Positive control	UCM	C5 ^a	98.3 ± 10.2^b
Chemotaxis 1st	UCM	NDCM	77.3 ± 11.5^{ab}
Chemotaxis 2nd	UCM	DCM	89.8 ± 11.3^{ab}
Chemokinesis 1st	NDCM	NDCM	76.0 ± 9.4^{ab}
Chemokinesis 2nd	DCM	DCM	76.5 ± 10.8^{ab}

a: $P < 0.01$, compared with positive control group. b: $P < 0.01$, compared with chemotaxis 2nd group.

表 2. 鼠抗人 RANTES 抗体对 DCM 诱导的 MC 趋化运动的抑制作用

Table 2. The inhibition effect of RANTES antibody on the MC chemotaxis induced by DCM ($n=60$)

Groups	Liquids of MC suspension in upper well	Experimental liquids in lower well	Migration distance(μm)
UCM	UCM	UCM	68.9 ± 11.8^a
UCM+ Ab	UCM	UCM+ Ab	71.6 ± 10.3^a
DCM	UCM	DCM	87.8 ± 10.5
DCM+ Ab	DCM	DCM+ Ab	72.9 ± 11.8^a

a: $P < 0.01$, compared with DCM group

抗 RANTES 抗体的抑制实验表明,DCM+ 抗体组引起的 MC 迁移距离明显小于仅含 DCM 的趋化运动组($P < 0.01$),而随机移动组和 UCM+ 抗体组之间,差异无显著性意义($P > 0.05$) (表 2, Table 2)。这一方面排除了抗体本身对 MC 趋化运动的影响,

另一方面说明 DCM 中含有能趋化单核细胞的趋化因子 RANTES。

3 讨论

脂质过氧化是一种氧自由基介导的细胞损伤机制,与动脉粥样硬化密切相关^[9]。联胺是一种巯基氧化剂,可降低细胞内谷胱甘肽过氧化物酶活性,进而诱导内皮细胞脂质过氧化损伤,导致单核细胞粘附于内皮增多^[9]。

RANTES 是 G-C 型趋化因子家族中的一员,对单核细胞、T 淋巴细胞^[4]、嗜酸性白细胞^[5]和嗜碱性白细胞^[6]等有趋化活性。RANTES 与动脉粥样硬化之间关系的研究较少,但已有报道, TNF- α 和 IFN- γ 可协同诱导人脐静脉内皮细胞表达 RANTES 增强^[7],在与移植相关的进展期动脉粥样硬化患者的冠状动脉内皮细胞中也可检测到 RANTES 的表达^[10]。由此可以推测, RANTES 和动脉粥样硬化的发生发展有一定关系。那么,脂质过氧化是否能诱导内皮细胞产生 RANTES? RANTES 在动脉粥样硬化的发展过程中到底有何作用? 本实验结果显示,联胺刺激内皮细胞所产生的条件培养基对 MC 有明显趋化作用而非化学促动作用。在条件培养基中加入鼠抗人 RANTES 抗体后, MC 迁移距离明显缩短,说明条件培养基中含有对 MC 有趋化活性的因子 RANTES。以上表明,联胺可促进内皮细胞产生单核细胞趋化因子 RANTES,这在动脉粥样硬化早期的单核细胞迁移运动中可能具有重要意义。

参考文献

- [1] Cybulsky MI, Gimbrone MJ. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis [J]. *Science (Wash DC)*, 1991, **252**: 788-791
- [2] 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 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1997, **5** (4): 291-294
- [3] 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): 202-205
- [4] Schall TJ, Bacon K, Toy KJ, et al. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES [J]. *Nature*, 1990, **347**: 669-671
- [5] Ebisawa M, Yamada T, Bickel C, et al. Eosinophil transendothelial migration induced by cytokines. III. Effect of the chemokine RANTES [J]. *J Immunol*. 1994, **153**: 2153-160
- [6] Bacon KB, Flores-Romo L, Aubry JP, et al. Interleukin 8 and RANTES induce the adhesion of the human basophilic cell line KU-812 to human endothelial cell monolayers [J]. *Immunology*, 1994,

- 82: 473- 481
- [7] Marfaing-Koka A, Devergne O, Gorgone G, et al. Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN-gamma plus TNF-alpha and inhibition by IL-4 and IL-13 [J]. *J Immunol*, 1995, **154**: 1 870- 878
- [8] 阮秋蓉, 邓仲端, 徐增绶, 等. 培养的人脐静脉内皮细胞产生单核细胞趋化因子的研究 [J]. *中华病理学杂志*, 1991, **20** (3): 205- 208
- [9] 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]. *中国医科大学学报*, 1994, **23** (3): 189- 193
- [10] Pattison JM, Nelson PJ, Huie P, et al. RANTES chemokine expression in trasplant-associated accelerated atherosclerosis [J]. *J Heart Lung Transplant*, 1996, **15** (12): 1 194- 199
- (此文 2000- 12- 27 收到, 2001- 07- 10 修回)
- (此文编辑 胡必利)

•读者•作者•编者•

《中国动脉硬化杂志》

欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎引用! 欢迎刊登广告!

《中国动脉硬化杂志》是中国科学技术协会主管、中国病理生理学会主办、南华大学承办的国家级专业性高级学术期刊。主要报道中医药学、预防医学、基础医学、临床医学、药学和特种医学中防治动脉硬化性疾病(如高脂蛋白血症、冠心病、高血压、脑动脉硬化、颈动脉硬化、四肢动脉硬化、缺血性脑血管疾病和其他缺血性疾病等)中的研究论文(含流行病学研究、实验研究、临床研究和方法学研究)、诊治经验、病例报道、知识讲座等。其办刊宗旨是:通过报道防治动脉硬化性疾病的新理论、新观点、新疗法、新药物;介绍防治的新经验和新知识;既引导和弘扬我国的学术研究,促进国内外学术交流,将中国这一领域的研究推向世界和末来;又普及防治知识,提高全民的健康水平。自创刊以来,以办刊严谨、内容丰富、编排新颖、对稿件处理快速及时、文章发表周期短、可读性强而深受广大作者和读者厚爱。

《中国动脉硬化杂志》现是科技部中国科学技术论文统计源期刊(自然科学核心期刊)、中国科学院《中国科学引文数据库》来源期刊和中国学术期刊综合评价数据库来源期刊,被国家科技部《万方数据期刊群》、《中国学术期刊(光盘版)》和《中国期刊网》全文收录,也被美国《化学文摘(CA)》和国内所有检索系统收录。根据中国科技期刊引证报告,《中国动脉硬化杂志》的影响因子(IF)逐年上升,说明她的作用力和影响力越来越大,1999年的影响因子为0.387,位居全国1372家中国科学技术论文统计源期刊(自然科学核心期刊)中的第178位。

《中国动脉硬化杂志》为双月刊,单月30日出版,A4开本,内芯96页,全铜版纸印刷。每期定价11.00元,全年66.00元。由湖南省报刊发行局发行,全国各级各地邮局均可订阅。中国动脉硬化杂志编辑部热忱欢迎海内外同仁和社会各届朋友向《中国动脉硬化杂志》投稿,到当地邮局订阅,邮发代号(医药卫生类)42-165。若错过邮局征订日期,可直接写信和邮汇订购费到编辑部补办订购手续。编辑部地址为:湖南省衡阳市南华大学内,中国动脉硬化杂志编辑部,邮政编码:421001,联系电话:(0734)8281289。个人向编辑部订阅,给予10元优惠。

《中国动脉硬化杂志》热情欢迎并采取下述措施激励广大同仁引用发表在本刊上的文章:凡在中国科学技术论文统计源期刊和中国科学引文数据库来源期刊上发表的文章中引用了本刊的文章者,凭当期刊封面、目次页和文章的复印件可获赠第二年全年刊物一份。

主编杨永宗和专职副主编胡必利率编辑部全体办刊人员向长期关心、爱护和支持《中国动脉硬化杂志》的海内外同仁和社会各界朋友致以衷心的感谢!祝愿您健康长寿,万事如意!