

## 脂质过氧化损伤诱导培养的人脐静脉内皮细胞 表达细胞间粘附分子 1

邹飞雁, 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, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 脂质过氧化; 内皮, 血管; 细胞间粘附分子 1; 联胺

[摘要] 为探讨脂质过氧化损伤能否诱导血管内皮细胞表达细胞间粘附分子 1, 用胰酶消化法分离人脐静脉内皮细胞进行原代培养, 内皮细胞用不同浓度联胺作用相同时间或同一浓度联胺作用不同时间, 使之发生脂质过氧化损伤, 逆转录聚合酶链反应检测内皮细胞细胞间粘附分子 1 mRNA 表达, 细胞酶链免疫吸附实验测定内皮细胞细胞间粘附分子 1 蛋白表达。逆转录聚合酶链反应结果发现, 不同浓度联胺(1  $\mu\text{mol/L}$ 、5  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$ ) 作用 8 h, 内皮细胞细胞间粘附分子 1 对  $\beta$ -actin 吸光度比值依次为 0.535、0.908 和 1.186, 分别是对照组(0.185)的 2.89 倍、4.91 倍和 6.41 倍; 而同一浓度联胺(5  $\mu\text{mol/L}$ ) 作用 4 h 和 24 h, 吸光度比值依次为 0.598 和 1.292, 分别是对照组(0.185)的 3.23 倍和 6.98 倍。细胞酶链免疫吸附实验结果发现, 经 1  $\mu\text{mol/L}$ 、5  $\mu\text{mol/L}$  和 10  $\mu\text{mol/L}$  联胺作用 4 h 后, 内皮细胞细胞间粘附分子 1 蛋白表达的吸光度值依次为 0.1387、0.1775 和 0.2326, 分别是对照组(0.1035)的 1.34 倍、1.71 倍和 2.25 倍( $P < 0.01$ )。结果表明, 联胺诱导的内皮细胞细胞间粘附分子 1 的表达在一定作用时间和浓度范围内呈时间和剂量依赖性。提示联胺诱导的脂质过氧化损伤可能上调细胞间粘附分子 1 mRNA 和蛋白的表达, 这可能在单核细胞聚积于内皮下间隙起重要作用。

[中图分类号] R392.11

[文献标识码] A

### Lipid Peroxidation Injury Induces Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells

ZOU Fei-Yan, DNEG Zhong-Duan, QU Zhi-Ling, and NI Juan

(Department of Pathology, Huazhong University of Science and Technology, Tongji Medical College, Wuhan 430030, China)

[MeSH] Lipid Peroxidation; Endothelium, Vascular; Intercellular Adhesion Molecule-1; Diamide

[ABSTRACT] **Aim** To observe whether lipid peroxidation injury to endothelial cells (EC) induces intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression. **Methods** The lipid peroxidation injury to cultured human umbilical vein endothelial cells (hUVEC) was induced by exposure of the cells to diamide either at a same concentration for different incubation time or at different concentrations, but for a same incubation times. The ICAM-1 mRNA expression in hUVEC was determined by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), and was normalized with  $\beta$ -actin mRNA. The ICAM-1 protein expression in hUVEC was determined by cell enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** RT-PCR showed that the ratios of the absorbance (A) values of ICAM-1 mRNA to that of the  $\beta$ -actin mRNA expressed in hUVEC exposed to diamide at different concentrations (1  $\mu\text{mol/L}$ , 5  $\mu\text{mol/L}$  and 10  $\mu\text{mol/L}$ ) for 8 h was 0.535, 0.908 and 1.186, respectively. Whereas the ratio of the A values of ICAM-1 mRNA to that of the  $\beta$ -actin mRNA expressed in hUVEC exposed to diamide at a concentration of 5  $\mu\text{mol/L}$  for 0, 4 h and 24 h was 0.185, 0.598 and 1.292, respectively. Cell ELISA showed that the A values of ICAM-1 protein expressed in hUVEC exposed to diamide at different concentrations (1  $\mu\text{mol/L}$ , 5  $\mu\text{mol/L}$  and 10  $\mu\text{mol/L}$ ) for 4 h were 0.1387, 0.1775 and 0.2326, which were 1.34-fold, 1.71-fold and 2.25-fold as much as that of the control group (0.1035), respectively. There was a significant statistical difference between groups ( $F = 38.89$ ,  $P < 0.01$ ). Taken together, these results suggest that ICAM-1 expression in hUVEC induced by diamide was in a dose- and time-dependent manner. **Conclusions** Lipid peroxidation injury to EC induced by diamide may up-regulate ICAM-1 mRNA and protein expression, which play an important role in the recruitment of monocytes into subendothelial space in atherogenesis.

血管内皮细胞(endothelial cell, EC)在一些有害因子如脂质过氧化、氧化型脂蛋白及内毒素等作用

下,可发生功能失调,诱导产生某些粘附分子<sup>[1,2]</sup>,导致血中白细胞粘附于内皮<sup>[3]</sup>,并迁入内皮下间隙,形成泡沫细胞<sup>[4]</sup>,促进动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发生发展。本研究从 mRNA 水平和蛋白表达方面探讨联胺诱导培养的人 EC 脂质过氧化后对细胞间粘附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1,

[收稿日期] 2001-09-14 [修回日期] 2002-02-20

[基金项目] 国家自然科学基金(39730220)资助。

[作者简介] 邹飞雁,女,1963 年出生,湖南省衡阳县人,博士研究生。邓仲端,男,1927 年出生,病理学教授,博士研究生导师,长期从事动脉粥样硬化发病机制的研究。

ICAM-1)表达的影响,为阐明EC的脂质过氧化损伤在As发生发展中的作用提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 人脐静脉内皮细胞的培养

参照文献[5],用胰酶消化法获取人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC),培养于含5%新生牛血清、10%胎牛血清、5%人血清和0.03%谷氨酰胺的M199培养基(Gibco公司),每2~3天更换培养液,待细胞达到亚汇合时,用0.25%胰蛋白酶消化传代。第2至3代细胞用于实验,显微镜下HUVEC呈铺路石样排列,鼠抗人第(II)因子抗体阳性。

### 1.2 实验分组

实验分六组: 对照组: 不加联胺; ④1 μmol/L组: 加1 μmol/L联胺温育8 h; ④5 μmol/L组: 加5 μmol/L联胺温育8 h; 10 μmol/L组: 加10 μmol/L联胺温育8 h; 4 h组: 加5 μmol/L联胺温育4 h; 24 h组: 加5 μmol/L联胺温育24 h。

### 1.3 逆转录聚合酶链反应

收集各组细胞,按TRIzol(Gibco公司)试剂说明书提取细胞总RNA。取各组细胞总RNA 3 μg逆转录合成cDNA,再取逆转录产物1 μL进行PCR循环。94℃变性1 min,61℃退火45 s,72℃延伸1.5 min,共34个循环,末次延伸72℃10 min,-20℃储存。PCR反应体系总体积为50 μL,包括1×PCR buffer、MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L、dNTPs 0.2 mmol/L、引物各20 pmol/L、Taq酶1 u。ICAM-1引物(上海博亚公司)序列为: 正链5'-CAC AAG CCA CGC CTC CCT GAA CCT A-3',负链5'-TGT GGG CCT TTG TGT TTT GAT GCT A-3',PCR扩增产物长度为458 bp。内参β-actin引物序列: 正链5'-CCT AGC ACC ATG AAG ACA A-3',负链5'-AGC CAT GCC AAA TGT CTC A-3',扩增产物长度为253 bp。取反应产物5 μL进行1.5%琼脂糖电泳,溴化乙锭染色。琼脂糖凝胶中的吸光度值用Gel Works ID Advanced V4.01软件分析目的基因和β-actin的积分吸光度(absorbance, A)值,二者的比值作为各组mRNA的相对表达量。实验重复三次。

### 1.4 细胞酶链免疫吸附实验

参照文献[6],将细胞接种于96孔板上,每组11孔。分别暴露于1 μmol/L、5 μmol/L和10 μmol/L联胺4 h,弃去培养液,用PBS洗涤。将每组8孔细胞用4%多聚甲醛固定,4℃20 min,用于细胞免疫学检测。加3%过氧化氢甲醇溶液10 min以灭活内源

性过氧化物酶。滴加正常山羊封闭血清,室温30 min,弃去多余部分,再加入1:50山羊抗人ICAM-1一抗,4℃过夜,PBS洗涤后加1:100兔抗山羊IgG二抗,37℃30 min后PBS洗涤,加链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC)37℃30 min,最后DAB避光显色5 min,用2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。用微量多道扫描光密度仪读其吸光度值(λ=490 nm)。另3孔细胞用0.1 mol/L NaOH 37℃裂解30 min,用Lowry法测细胞裂解物总蛋白量,以使各组细胞量标准化。实验重复三次。

### 1.5 统计学分析

各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间以方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 联胺对细胞间粘附分子1 mRNA表达的影响

逆转录聚合酶链反应显示,各组细胞均表达ICAM-1 mRNA(图1, Figure 1)。从表(Table 1)可见,加联胺各组(1 μmol/L组、5 μmol/L组、10 μmol/L组、4 h组和24 h组)ICAM-1 mRNA的表达比对照组明显增多,分别为对照组的2.89倍、4.91倍、6.41倍、3.23倍和6.98倍。

表1. 联胺对细胞间粘附分子1 mRNA表达的影响。

Table 1. Effects of diamide on expression of ICAM-1 mRNA.

Groups	The ratios of A values of ICAM-1 to β-actin
Control	0.185
1 μmol/L	0.535
5 μmol/L	0.908
10 μmol/L	1.186
4 h	0.598
24 h	1.292

### 2.2 联胺对细胞间粘附分子1蛋白表达的影响

加联胺各组(1 μmol/L组、5 μmol/L组和10 μmol/L组)ICAM-1蛋白的表达分别是对照组的1.34倍、1.71倍和2.25倍,5 μmol/L组是1 μmol/L组的1.28倍,10 μmol/L组是5 μmol/L组的1.31倍,经方差分析,组间差异有显著性( $P < 0.01$ )。联胺诱导的HUVEC脂质过氧化损伤上调ICAM-1蛋白的表达,并呈剂量依赖性关系。

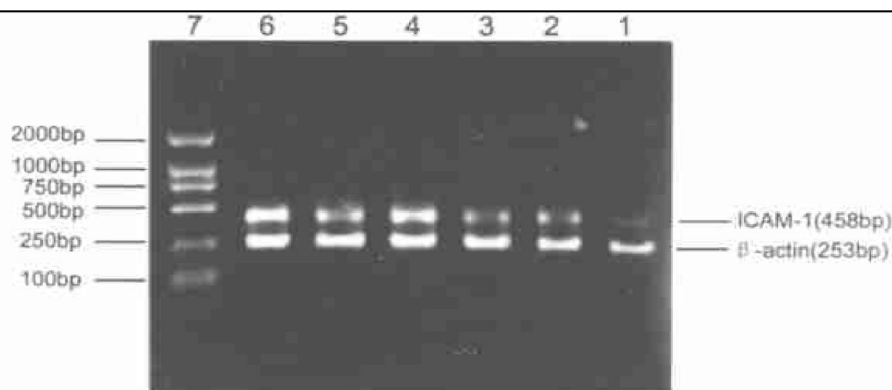


图 1. 逆转录聚合酶链反应产物琼脂糖凝胶电泳.

**Figure 1. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products.** 1: control group; 2: 1  $\mu\text{mol/L}$  group; 3: 4 h group; 4: 10  $\mu\text{mol/L}$  group; 5: 5  $\mu\text{mol/L}$  group; 6: 24 h group; 7: Marker.

表 2. 联胺对细胞间粘附分子 1 蛋白表达的影响.

**Table 2. The effect of diamide on expression of ICAM-1 protein** ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ ).

Groups	Absorbance values
Control	0.1035 $\pm$ 0.0107
1 $\mu\text{mol/L}$	0.1387 $\pm$ 0.0417 <sup>a</sup>
5 $\mu\text{mol/L}$	0.1775 $\pm$ 0.0059 <sup>ab</sup>
10 $\mu\text{mol/L}$	0.2326 $\pm$ 0.0051 <sup>abc</sup>

a:  $P < 0.01$ , compared with control group; b:  $P < 0.01$ , compared with 1  $\mu\text{mol/L}$  group; c:  $P < 0.01$ , compared with 5  $\mu\text{mol/L}$  group.

### 3 讨论

近年来, 内皮细胞脂质过氧化损伤与 As 的关系日益受到重视。As 及与 As 密切相关的疾病, 如高胆固醇血症、糖尿病等患者血清中过氧化脂质 (lipid peroxide, LPO) 含量升高, 且 LPO 可引起血管内皮细胞形态损伤和功能障碍, 促进 As 病变的形成<sup>[7]</sup>。联胺是一种脂质过氧化引发剂, 作用于 hUVEC, 测得 LPO 的代谢终产物丙二醛的含量随培养基中联胺浓度增加而增加<sup>[8,9]</sup>, 且联胺诱导单核细胞粘附于血管内皮增多<sup>[8]</sup>, 这提示内皮细胞表达某些粘附分子增加。Printseva 等<sup>[1]</sup>第一次证明了人 As 病变中内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞表达 ICAM-1, 其中脂纹病变表达量最大。正常人动脉内皮及斑块以外的内膜和平滑肌细胞不表达或仅轻微表达 ICAM-1。他们认为, ICAM-1 在内皮细胞表达涉及单核细胞和淋巴细胞向内皮的粘附及迁移。我们的研究表明, 正常的内皮细胞可表达基础水平 ICAM-1, 一定浓度联胺作用一定时间后, hUVEC 表达 ICAM-1 增多, 并在所加联胺浓度不致引起内皮细胞剥脱性损伤的情况下, ICAM-1 的表达与所加联胺浓度和作用时间成

正比, 表明单核细胞粘附于内皮增多与内皮细胞表达 ICAM-1 增加有关。

联胺促 As 作用还可能涉及内皮细胞氧化还原状态失调, 导致还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平下降, 氧化型谷胱甘肽 (oxidized glutathione, GSSG) 水平上升, 血中白细胞粘附于 hUVEC 增多<sup>[3]</sup>。联胺亦可作为蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂, 导致核因子 B 激活, 诱导内皮细胞 ICAM-1 表达增多<sup>[10]</sup>, 促进血中白细胞粘附于内皮, 进一步聚积于内皮下间隙, 对 As 发生发展起重要作用。

#### [参考文献]

- [1] Printseva OY, Peclo MM, Gown AM. Various cell types in human atherosclerotic lesions express ICAM-1. Further immunocytochemical and immunochemical studies employing monoclonal antibody, 10F3. *Am J Pathol*, 1992, **140** (4): 889-896
- [2] 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症蛋白 1 $\alpha$  和血管细胞粘附分子 1. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (3): 202-205
- [3] Kokura S, Wolf RE, Yoshikawa T, et al. Molecular mechanisms of neutrophil-endothelial cell adhesion induced by Redox imbalance. *Circulation Research*, 1999, **84**: 516-524
- [4] Ross R. Atherosclerosis—As inflammatory disease. *New Engl Med*, 1999, **340** (2): 115-126
- [5] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J Clin Invest*, 1973, **52**: 2 745-752
- [6] Nakagawa T, Nozaki S, Nishida M, et al. Oxidized LDL increases and interferon- $\gamma$  decreases expression of CD36 in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18**: 1 350-357
- [7] Hennig B, Chow CK. Lipid peroxidation and endothelial cell injury: Implication in atherosclerosis. *Free Radical Bio Med*, 1988, **4**: 99-108
- [8] 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. *中国医科大学学报*, 1994, **23** (3): 189-193
- [9] 杨丽敏, 邓仲端, 瞿智玲, 等. 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症蛋白 1 $\alpha$ . *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (2): 96-99
- [10] Dhawan S, Singh S, Aggarwal BB. Induction of endothelial cell surface adhesion molecules by tumor necrosis factor is blocked by protein tyrosine phosphatase inhibitors: role of the nuclear transcription factor NF- $\kappa$ B. *Eur J Immunol*, 1997, **27**: 2 172-179

(此文编辑 文玉珊)