

单核细胞与内皮细胞的相互作用及其促细胞因子分泌的机制

刘瑞¹, 马爱群², 白玲², 郝春媛², 刘进军¹

(1. 西安交通大学医学院病理生理学教研室, 陕西省西安市 710061;

2. 西安交通大学第一医院心血管内科, 陕西省西安市 710061)

[关键词] 病理生理学; 粘附分子介导细胞因子分泌的过程; 细胞混合培养; 动脉粥样硬化; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素 1β ; 巨噬细胞集落刺激因子

[摘要] 为研究单核细胞、内皮细胞的相互作用对肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 和巨噬细胞集落刺激因子分泌的影响以及粘附分子在其中的作用, 采用单核细胞、内皮细胞单独培养及混合培养的方法, 在混合培养条件下预加入细胞间粘附分子 1、血管细胞粘附分子 1 和内皮选择素的单克隆抗体, 通过酶联免疫吸附试验检测培养液中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 和巨噬细胞集落刺激因子的含量。结果发现, 单核细胞和内皮细胞单独培养条件下观测不到肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 和巨噬细胞集落刺激因子的分泌, 两种细胞混合培养时, 3 种细胞因子的分泌显著升高($P < 0.05$), 细胞间的接触粘附起着重要介导作用, 内皮选择素在促使肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 分泌的环节中占据主导地位, 细胞间粘附分子 1 在促使巨噬细胞集落刺激因子分泌的机制中占据主导地位。表明单核细胞与内皮细胞的粘附能够激活某些基因的信号转导途径, 使肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 和巨噬细胞集落刺激因子的分泌增加, 粘附分子在其中起着重要的介导作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effects of Monocyte-Endothelium Interaction on the Secretion of Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin- 1β and Macrophage Colony-stimulating Factor and Its Mechanism Mediated by Adhesion Molecules

LIU Rui¹, MA Ai-Qun², BAI Ling², HAO Chun-Yuan², and LIU Jin-Jun¹

(1. Department of Pathophysiology, Medical School, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061; 2. Cardiovascular Department of the First Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Tumor Necrosis Factor- α ; Interleukin- 1β ; Macrophage Colony-stimulating Factor; Cell Adhesion Molecules; Cell Culture

[ABSTRACT] **Aim** To examine the effects of monocyte-endothelium interaction on the secretion of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin- 1β (IL- 1β) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), and to explore the functions of adhesion molecules in the process. **Methods** Monocytes and endothelial cells were cultured alone or cocultured to form different cell culture conditions. Pretreatments with monoclonal antibody of human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and endothelium selectin (E-selectin) were carried out in cocultured groups. The levels of TNF- α , IL- 1β and M-CSF in culture medium were determined by enzyme linked immune sandwich assay technique. **Results**

There was no secretion of TNF- α , IL- 1β and M-CSF observed in monocytes or endothelial cells culture alone. The secretion of three types of cytokines increased significantly when two types of cells were cocultured ($P < 0.05$). Direct contact between monocytes and endothelial cells played an important mediated role in the process. E-selectin played the principal role in activating the secretion of TNF- α and IL- 1β , and ICAM-1 was the most principal adhesion molecule to mediate the secretion of M-CSF.

Conclusion The adhesion of monocytes to endothelial cells can activate certain signal transduction, resulting in significantly increased secretion of TNF- α , IL- 1β and M-CSF. Adhesion molecules play a pivotal role in the process.

细胞间粘附分子 1 (intercellular adhesion molecule-

1, ICAM-1)、血管细胞粘附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 以及内皮选择素在内皮细胞与白细胞的粘附中起主要作用^[1]。但是, 两种细胞粘附并不仅仅只是物理接触, 细胞与细胞之间在接触的过程中, 会触发一些相应的信号转导途径, 引起细胞的功能发生变化。Funayama^[2]等发现, 单核细胞与内皮细胞的相互作用可以促使肿瘤坏死因子

[收稿日期] 2002-10-05 [修回日期] 2003-04-15

[基金项目] 教育部行动计划资助项目

[作者简介] 刘瑞, 男, 1974 年出生, 陕西汉中市中人, 讲师, 硕士研究生, 现从事动脉粥样硬化发病机制的研究; 电话: 029-5275164, E-mail: liurui@mail.xjtu.edu.cn。马爱群, 男, 1957 年出生, 湖北武汉市人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠状动脉疾病和心力衰竭的防治研究。白玲, 女, 1971 年出生, 陕西绥德县人, 主治医师, 博士研究生, 研究方向为泡沫细胞形成的分子机制。

α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)的分泌增加。Zhu^[3]等使用单核细胞与平滑肌细胞共培养,发现有一定水平的 TNF- α 和 IL-1 β 的分泌,说明两种细胞的相互作用可以激活某些细胞因子基因的表达。但在他们的试验中,对于两种细胞相互作用引起细胞因子分泌的具体机制并未进行更加深入的研究,国内外也未见有类似的报道。本实验拟通过单核细胞、内皮细胞单独及混合培养的方法,观察两种细胞的相互作用对 TNF- α 、IL-1 β 和巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)分泌的影响以及粘附分子在其中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

内皮细胞株 ECV304 和单核细胞株 U937(本室保存);胰蛋白酶(美国 Sigma 公司);RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司);小牛血清(深圳华美生物工程公司);TNF- α 酶联免疫吸附测定试剂盒、IL- β 酶联免疫吸附测定试剂盒、M-CSF 酶联免疫吸附测定试剂盒、ICAM-1 单克隆抗体、VCAM-1 单克隆抗体、内皮选择素单克隆抗体(上海森雄生物有限公司);其他试剂均为国产分析纯。

1.2 试验分组

每组试验均用 12 孔培养板,每孔接种的内皮细胞密度为 $1.0 \times 10^8/L$,接种的单核细胞密度为 $2.0 \times 10^9/L$ 。试验分为 7 组,分别为内皮细胞单独培养组、单核细胞单独培养组、条件培养组(提取内皮细胞培养后的培养液再单独培养单核细胞)、单纯混合培养组(不预加粘附分子的单克隆抗体)和混合培养时分别预加入粘附分子 ICAM-1、VCAM-1、内皮选择素的单克隆抗体后继续培养组。对于混合培养组,待内皮细胞铺满培养孔底时,吸去培养液,用无血清培养液冲洗 2 次,加入已用无血清培养液调整好密度的单核细胞;包含粘附分子单克隆抗体的几个组,在加入单核细胞前,预加入 ICAM-1、VCAM-1、内皮选择素的单克隆抗体,浓度为 5 mg/L,孵育 0.5 h,再加入单核细胞,共培养 12 h 后吸取上清液,离心去掉残余的细胞,保存于 $-20^\circ C$ 待测;对于条件培养组,内皮细胞无血清培养 12 h,然后吸取上清液,加入到单核细胞继续培养 12 h,留取上清液待测。

1.3 标本的检测

每组均在无血清培养后 12 h 留取标本, TNF- α 、IL-1 β 、M-CSF 的测定均采用双抗体夹心酶联免疫

吸附试验方法。④粘附率的计算:混合培养各个组在无血清培养 12 h 留取上清液后,用 PBS 冲洗两遍,收集冲洗液中单核细胞计数,以单核细胞单独培养组的细胞数为参照值,计算出粘附率;粘附率计算公式为:粘附率=(总细胞数-未粘附的细胞)/总细胞数。

1.4 统计学处理

试验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据处理根据方差齐性分析的结果,进一步使用 q 检验,进行组间差异的比较,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。所有统计工作由 SPSS 9.0 统计软件完成。

2 结果

2.1 不同培养条件对肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 和巨噬细胞集落刺激因子分泌的影响

单核细胞与内皮细胞单独培养几乎无 TNF- α 、IL-1 β 和 M-CSF 的分泌,两种细胞混合培养时,3 种细胞因子的分泌量显著增高。混合培养前预加 ICAM-1、VCAM-1 和内皮选择素的单克隆抗体(5 mg/L),均可不同程度地抑制这 3 种细胞因子的分泌,但抑制程度不尽相同。加入内皮选择素的单克隆抗体对 TNF- α 、IL-1 β 分泌的抑制程度最大,加入 ICAM-1 的单克隆抗体对 M-CSF 分泌的抑制程度最大。条件培养组里,培养内皮细胞的培养液再单独培养单核细胞,也会促使 TNF- α 、IL-1 β 和 M-CSF 的分泌,但相对于两种细胞混合培养,细胞因子分泌增加的幅度较小。对于 IL-1 β 和 M-CSF,各组之间均有显著性差异($P < 0.05$) (表 1, Table 1)。

2.2 3 种粘附分子单克隆抗体对单核细胞、内皮细胞粘附率的影响

加入 3 种粘附分子的单克隆抗体(5 mg/L)都可以显著降低单核细胞与内皮细胞的粘附率($P < 0.05$),加入 ICAM-1、VCAM-1、内皮选择素的单克隆抗体后,使单核细胞与内皮细胞的粘附率从 $67\% \pm 3\%$ 分别下降到 $31\% \pm 5\%$ 、 $57\% \pm 3\%$ 和 $58\% \pm 5\%$,其中 ICAM-1 的抗体对粘附率降低的程度最大。

3 讨论

在动脉粥样硬化发展过程中,单核细胞粘附于内皮细胞以及继发渗出不仅仅是发展的第一步,而且在整个病理过程中起着重要的作用。循环的单核细胞粘附于内皮,继发向血管壁迁移并分化为成熟巨噬细胞,在这个过程中,单核细胞的粘附聚集是由内皮细胞表面的诱导性粘附分子所介导的^[4]。

表 1. 不同培养条件对肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 和巨噬细胞集落刺激因子分泌的影响Table 1. Effects of different culture conditions on the secretion of TNF- α , IL- 1β and M-CSF

分 组	n	TNF- α (ng/L)	IL- 1β (ng/L)	M-CSF(ng/L)
单核细胞单独培养	5	未测出	未测出	< 31
内皮细胞单独培养	5	未测出	未测出	< 31
条件培养	5	15.78 \pm 0.54	49.49 \pm 8.16	88.67 \pm 19.63
单纯混合培养	5	24.00 \pm 0.87 ^a	199.76 \pm 11.09	536.95 \pm 56.15
预加 ICAM-1 抗体后混合培养	5	22.92 \pm 0.65	169.97 \pm 7.93	299.50 \pm 48.29
预加 VCAM-1 抗体后混合培养	5	22.82 \pm 1.03	185.56 \pm 9.80	451.97 \pm 35.59
预加内皮选择素抗体后混合培养	5	19.60 \pm 0.74 ^b	84.25 \pm 7.87	355.87 \pm 30.69

a: $P < 0.05$, 与其他组比较有显著性差异; b: $P < 0.05$, 与 ICAM-1 抗体组和 VCAM-1 抗体组比较有显著性差异。TNF- α : 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α); IL- 1β : 白细胞介素 1β (interleukin 1 beta); M-CSF: 巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor); ICAM-1: 细胞间粘附分子 1 (intercellular adhesion molecule 1); VCAM-1: 血管细胞粘附分子 1 (vascular cell adhesion molecule 1)。

在单核细胞和内皮细胞的粘附过程中, 哪一种粘附分子占主要地位, 仍未取得共识^[5,6]。本试验发现阻断 3 种粘附分子后, 粘附率与对照组相比都有显著性降低 ($P < 0.05$)。阻断 ICAM-1 的作用后, 粘附率几乎下降了 50%, 而阻断 VCAM-1 组和内皮选择素组粘附率的下降幅度并不太大。显然, ICAM-1 在单核细胞与内皮细胞的粘附中起着主要作用, VCAM-1 和内皮选择素对于两种细胞的粘附也起着一定的作用, 但相对于 ICAM-1 来说, 作用较弱。本试验结果与 Smalley 等^[5]的试验结果相一致, 在他们的试验中, 使用 ICAM-1 的抗体使单核细胞与内皮细胞的粘附率下降了大约 80%。

实验中使用内皮细胞单独培养的条件培养液加入到单核细胞继续培养, 发现也会引起 TNF- α 、IL- 1β 及 M-CSF 的释放, 尽管分泌量较少。说明内皮细胞自身即可以分泌一些活性物质 (也许是细胞因子或者是细胞膜上脱落的小分子物质等等), 作用于单核细胞引起某些细胞因子的表达上调, 内皮细胞存在对单核细胞的旁分泌效应。但两种细胞间的作用是相互的, 单核细胞是否也存在对内皮细胞的旁分泌效应? 这从理论上说应该存在, 因为体内的各种细胞很大程度上正是通过旁分泌作用进行着信息的交换, 彼此形成旁分泌性网络, 调节各自的生理功能, 当然单核细胞对于内皮细胞的这种旁分泌效应还需要通过试验进一步论证。

试验结果表明, 粘附分子不但介导着物理性的粘附效应, 而且还与某些细胞因子的信号转导路径相联系。对于内皮选择素, 本实验中发现其对粘附率的影响较小, 但对 TNF- α 、IL- 1β 的分泌影响显著, 显然其作为物理性粘附的功能远没有其作为信号转导的功能重要。内皮选择素参与信号转导途径的原

因可能在于, 内皮选择素与其相应配基的结合会激活某些转录因子, 其中内皮选择素的配基唾液酸 Lewis 抗原直接介入内皮选择素的信号传递作用, 唾液酸 Lewis 抗原能上调活化蛋白 1 转录因子的水平, 另外, 选择素的配基也能诱导核转录因子。

实验时, 在单核细胞与内皮细胞粘附的过程中, TNF- α 、IL- 1β 以及 M-CSF 的分泌与 ICAM-1、VCAM-1 也存在着不同程度的相关性。免疫球蛋白家族中的 ICAM-1 与 VCAM-1 之所以也与某些基因的活化相关联, 原因可能在于其配基整合素能激发细胞内的信号转导路径。

试验表明单核细胞与内皮细胞的粘附并非单纯的物理性接触, 而且自身还与相应的细胞信号转导路径相偶联, 两种细胞的粘附可以促进 TNF- α 、IL- 1β 以及 M-CSF 的分泌, 而粘附分子在其中起着重要的介导作用。本课题深化了动脉粥样硬化发病的基础研究, 同时也为临床使用抗粘附的方法预防和治疗动脉粥样硬化提供了新的理论依据及思路。

[参考文献]

- [1] 蔡强军, 陈纪林. 单核-内皮细胞相互作用与动脉粥样硬化研究进展. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10 (1): 83-85
- [2] Funayama H, Ikeda U, Takahashi M, Sakata Y, Kitagawa S, Takahashi Y. Human monocyte endothelial cell interaction induces platelet-derived growth factor expression. *Cardiovascular Research*, 1998, 37 (1): 216-224
- [3] Zhu Y, Guo JX. Effects of cells interaction on matrix metalloproteinase 1 production. *Chinese Circulation Journal*, 2000, 15 (5): 308-310
- [4] 林勇, 黎健, 孙颂三, 汪钟. 单核细胞及中性粒细胞与内皮细胞粘附的区别. 中国动脉硬化杂志, 1999, 7 (3): 244-247
- [5] Smalley DM, Lin JH, Curtis ML, Kobari Y, Sterneman MB, Pritchard KA. Native LDL increases endothelial cell adhesiveness by inducing intercellular adhesion molecule 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, 16 (4): 585-590
- [6] Huo Y, Hafezi-Moghadam A, Ley K. Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connectin segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerosis lesions. *Circ Res*, 2000, 87 (2): 153-159

(此文编辑 曾学清)