

[文章编号] 1007-3949(2004)12-05-0541-04

• 实验研究 •

## 肥大细胞对平滑肌源性泡沫细胞 iv型胶原和 Ⅲ型胶原表达的影响

甘 露, 刘录山, 万载阳, 万腊香, 杨永宗

(南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 肥大细胞对胶原表达的影响; 逆转录聚合酶链反应; 肥大细胞; 平滑肌细胞; 胶原; 动脉粥样硬化

[摘要] 探讨大鼠腹腔肥大细胞对平滑肌源性泡沫细胞 iv 型胶原和 Ⅲ型胶原表达的影响。用大鼠腹腔肥大细胞上清液和氧化型低密度脂蛋白处理平滑肌细胞 48 h 后, 逆转录聚合酶链反应检测平滑肌细胞 iv 型胶原和 Ⅲ型胶原 mRNA 的表达, 免疫细胞化学染色检测平滑肌细胞 iv 型胶原和 Ⅲ型胶原蛋白的表达。结果发现, 与对照组相比, 处理组平滑肌细胞 iv 型胶原和 Ⅲ型胶原的 mRNA 表达降低, 免疫细胞化学染色后, 处理组细胞浆内棕色颗粒比对照组少且染色浅。结果提示, 肥大细胞在体外抑制平滑肌细胞 iv 型胶原和 Ⅲ型胶原表达, 并且能协同氧化型低密度脂蛋白对 iv 型胶原和 Ⅲ型胶原表达的抑制作用。肥大细胞释放的炎症介质可能参与了动脉粥样斑块纤维帽的重构。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effect of Mast Cell on Collagen iv and Ⅲ Expression in Foaming Smooth Muscle Cell

GAN Lu, LIU Lu-Shan, TANG Chao-Ke, WAN Zai-Yang, and YANG Yong-Zong

(Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Mast Cell; Smooth Muscle Cell; Collagen; Atherosclerosis; Oxidized Low Density Lipoprotein; Rat

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of rat peritoneal mast cell on collagen iv and Ⅲ expression in foaming smooth muscle cell (SMC). **Methods** SMC were treated with the supernatant of mast cell complemented with 100mg/L oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) for 48h. The mRNA expressions of collagen iv and Ⅲ were detected by RT-PCR. Immunocytochemistry staining was used to detect the protein expression of collagen iv and Ⅲ. **Results** With exposure to mast cell supernatant and ox-LDL, the expression of collagen iv and Ⅲ in SMC decreased. **Conclusions** Mast cell inhibits SMC collagen iv and Ⅲ expression in vitro. Our findings support the hypothesis that mediums released from activated mast cell in atherosclerotic plaques contributes to cap remodeling.

肥大细胞(mast cell, MC)是一种参与炎症免疫应答反应的炎症细胞,最近的研究表明肥大细胞在动脉粥样硬化中发挥着多重作用,特别是在斑块的不稳定性中起着关键作用。斑块内细胞外基质成分(尤其是胶原)减少是导致斑块不稳定的一个重要因素,而在动脉壁内胶原主要由平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)合成。我们在前期实验中发现,氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)可诱导大鼠腹腔 MC 脱颗粒,将 ox-LDL、大鼠腹腔 MC 与 SMC 共孵育 48 h 后,MC 可明显加速 SMC 泡沫化。因此我们设计本实验以观察 MC 对平滑肌源性泡沫细胞 iv 型胶原和 Ⅲ型胶原表达的影响,进

一步探讨 MC 和斑块稳定性之间的联系。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

DMEM 培养基、Trizol 试剂购自 Gibco 公司, RT 试剂盒购自 Promega 公司, iv、Ⅲ型胶原一抗及 SABC 试剂盒购自武汉博士德, Taq 酶购自上海生工, 引物由上海生工合成。

### 1.2 实验动物

SD 大鼠购自中南大学湘雅医学院实验动物学部, 体重约 200 g, 雌雄不限, 供采集 MC 和培养 SMC。

### 1.3 氧化型低密度脂蛋白的制备和鉴定

健康人血浆购自衡阳市血站。按本实验室常规方法<sup>[1]</sup>制备 LDL, 提纯的 LDL 在含 10 μmol/L CuSO<sub>4</sub> 的 PBS 中, 于 37℃氧化 12 h, 然后在含 100 mg/L ED-

[收稿日期] 2003-12-24

[修回日期] 2004-05-24

[作者简介] 甘露, 硕士研究生, E-mail 为 honeydewgl@yahoo.com.cn。杨永宗, 教授, 博士研究生导师, E-mail 为 YZYang@mail.hy.hn.Cn, 本文通讯作者。

TA 的 PBS 中透析, 每 8 h 换液一次, 透析 24 h。BCA 试剂定量蛋白, 过滤除菌, 4℃保存备用。

取氧化前后的 LDL, 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 2.5% 考马斯亮蓝常规染色, 脱色后可见清晰的 LDL 条带, 扫描仪收集图像。

#### 1.4 细胞培养和分组

**1.4.1 肥大细胞采集分离** 参照文献[2]梯度密度离心分离 MC 方法。取 SD 大鼠无菌条件下腹腔内注入 D-Hank's 液 10 mL, 轻揉腹部, 收集腹腔冲洗液。4℃、1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 将细胞悬液缓慢沿管壁加入比重为 1.082 的淋巴细胞分离液液面上, 使两者形成界面。4℃、4 000 r/min 离心 15 min, MC 沉于管底, 用冷 PBS 缓冲液离心清洗 2 次(4℃、1 000 r/min, 10 min)。以 DMEM 培养基悬浮 MC 以备(涂片做甲苯胺蓝染色, 光镜下计数测定 MC 纯度达 85%~95%)。

**1.4.2 肥大细胞上清液的提取** 将以 DMEM 培养基悬浮的 MC 悬液置于 -20℃ 冰箱冰冻, 再经 37℃ 溶化, 反复 3 次, 镜检无完整细胞。800 g 离心 5 min, 取上清(含 MC 介质)备用。

**1.4.3 大鼠主动脉平滑肌细胞原代培养** 采用组织块法培养 SMC。健康成年 SD 大鼠, 雄性, 体重 200 g 左右, 断头处死。无菌条件下分离胸腹主动脉, D-Hank's 液冲洗主动脉 3~5 遍, 剥去动脉外膜, 纵行剖开血管, 小心刮去内膜, 用 DMEM 培养基冲洗一次。将主动脉剪成 1 mm<sup>3</sup> 左右的组织块, 将组织块贴于 25 mL 培养瓶底, 培养箱孵育 4~6 h 后, 缓慢加入含 20% 小牛血清的培养基, 放入培养箱中继续培养。7 天左右可见细胞贴壁长出, 原代细胞生长呈汇合状态时, 按常规方法以含 10% 小牛血清的培养基传代, 取 3~8 代细胞用于实验。 $\alpha$ -actin 染色鉴定 SMC。

**1.4.4 实验分组** 消化收集纯化的 SMC, 以  $3 \times 10^5$  细胞数接种于 50 mL 培养瓶内, 待 SMC 汇合生长后, 无血清(含 2% 小牛血清) DMEM 饥饿培养 24 h, 使细胞同步化; 分离提纯 MC, 提取 MC 上清液。分 4 组进行实验: 对照组为 SMC 在 5 mL 含 10% 小牛血清的 DMEM 中培养 48 h; ox-LDL 组为 SMC 在 5 mL 含 10% 小牛血清的 DMEM 中, 加 ox-LDL 至终浓度为 100 mg/L, 培养 48 h; MC 上清液组为 SMC 在 5 mL 含 10% 小牛血清的 MC 上清液(由含  $1 \times 10^6$  个 MC 的细胞悬液提取)中培养 48 h; MC 上清液+ ox-LDL 组为 SMC 在 5 mL 含 10% 小牛血清的 MC 上清液(由含  $1 \times 10^6$  个 MC 的细胞悬液提取)中, 加 ox-LDL 至终浓度为 100 mg/L, 培养 48 h。

#### 1.5 平滑肌细胞油红 O 染色

将贴壁于盖玻片的 SMC 以 PBS 液冲洗 3 次, 于 10% 甲醛中固定 24 h, 水洗 5 min; 在 60% 异丙醇中放置 5 min, 用新过滤的油红 O(储备液含 0.5% 油红 O、98% 异丙醇, 用前以水稀释至 50%, 24 h 后过滤)染色 10 min; 用 60% 异丙醇分化 5 min, 水洗 5 min; 用苏木素染色 5 min, 水洗 30 min, 干燥封片。

#### 1.6 逆转录聚合酶链反应检测 iv 型胶原和 $\alpha$ 型胶原 mRNA 的表达

按 Trizol 试剂盒说明提取各组细胞总 RNA。逆转录反应参考说明书中的方法, 用 Promega 公司试剂盒完成。PCR 引物序列 iv 型胶原为 5'-GAC ACT GAA CCC TTT GTA ATG-3' (sense) 和 5'-GTG AAA CTC CCG TCT GCT-3' (antisense), 扩增片段长度为 399 bp;  $\alpha$  型胶原为 5'-AGC GGA GAA TAC TGG GTT-3' (sense) 和 5'-TGT AAT GTT CTG GGA GGC-3' (antisense), 扩增片段长度为 288 bp; 内参照采用  $\beta$ -actin, 引物序列为 5'-GTG GGG CGC CCC AGG CAC CA-3' (sense) 和 5'-CTC CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC-3' (antisense), 扩增片段长度为 548 bp。PCR 反应条件 iv 型胶原为 94℃ 预变性 5 min  $\rightarrow$  94℃ 变性 1 min  $\rightarrow$  53℃ 退火 1 min  $\rightarrow$  72℃ 延伸 1 min, 38 个循环, 72℃ 延伸 7 min;  $\alpha$  型胶原为 94℃ 预变性 5 min  $\rightarrow$  94℃ 变性 1 min  $\rightarrow$  55℃ 退火 1 min  $\rightarrow$  72℃ 延伸 1 min, 30 个循环  $\rightarrow$  72℃ 延伸 7 min。RT-PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳, 加样量均为 10  $\mu$ L。电泳条带采用凝胶成像分析系统做积分吸光度测定和分析, 以各组目的基因与内参照基因的吸光度值的比值来比较各组的 iv 型胶原和  $\alpha$  型胶原的 mRNA 表达差异。

#### 1.7 免疫细胞化学法检测 iv 型胶原和 $\alpha$ 型胶原蛋白表达

按 SABC 试剂盒说明书做免疫细胞化学染色。细胞接种于置有盖玻片的六孔培养板内, 处理结束后, 纯丙酮室温固定 20 min, PBS 液洗; 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 份 + 纯甲醇 50 份(体积比)混合, 室温浸泡 30 min, PBS 液洗; 滴加封闭液, 室温 20 min, 倾去多余液体, 不洗; 滴加一抗, 4℃ 过夜, PBS 液洗; 滴加二抗, 37℃ 孵育 20 min, PBS 液洗; 室温下 DAB 显色, 显微镜下控制反应时间, PBS 液洗; 苏木素轻度复染, 脱水, 透明, 封片。

#### 1.8 统计学分析

RT-PCR 电泳条带的结果用凝胶成像分析系统采集图像并进行积分吸光度测定和分析。

## 2 结果

## 2.1 细胞形态变化

对照组细胞胞浆内无或仅有少许染成红色的脂滴;  $\alpha\omega$ -LDL 组细胞与 MC 上清液组细胞胞浆内均有

较多染成红色的脂滴, 但脂滴较细小; MC 上清液+ $\alpha\omega$ -LDL 组细胞胞浆内存在大量红色脂滴, 且脂滴粗大(图 1, Figure 1)。

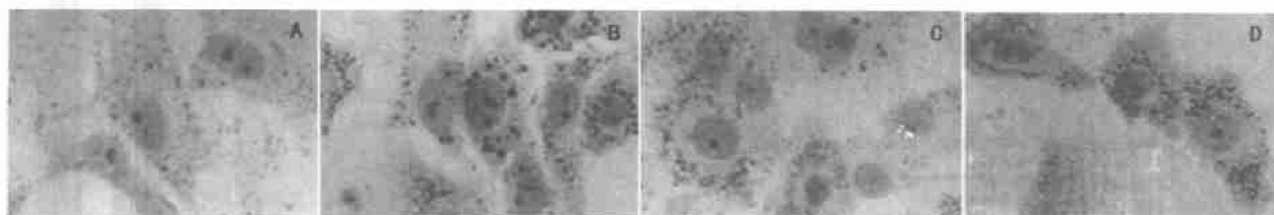


图 1. 平滑肌细胞油红 O 染色 ( $10\times 40$ ) A 为对照组, B 为氧化型低密度脂蛋白组, C 为肥大细胞上清液组, D 为肥大细胞上清液+氧化型低密度脂蛋白组。

Figure 1. Oil red O staining of SMC

## 2.2 平滑肌细胞 iv 型胶原和 Ⅲ型胶原 mRNA 表达

与对照组 SMC 相比, 用  $\alpha\omega$ -LDL 或 MC 上清液分别处理 SMC 48 h 后, iv 型胶原和 Ⅲ型胶原的 mRNA

表达均降低, 用  $\alpha\omega$ -LDL 和 MC 上清液同时处理 SMC 48 h 后, iv 型胶原和 Ⅲ型胶原的 mRNA 表达降低更明显(表 1 和图 2, Table 1 and Figure 2)。

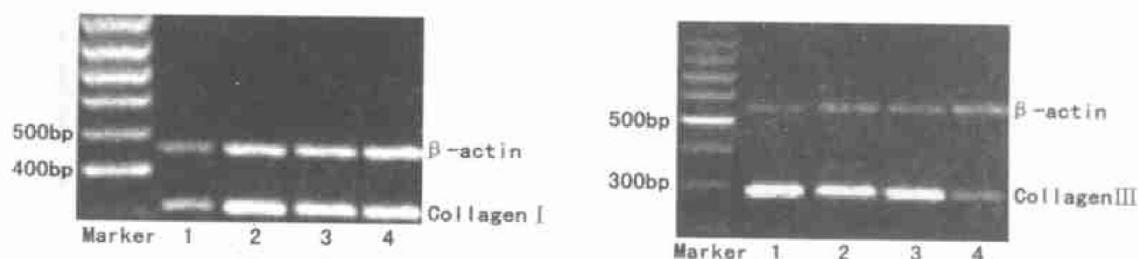


图 2. 逆转录聚合酶链反应检测平滑肌细胞 iv 型胶原和 Ⅲ型胶原 mRNA 的表达 Marker 为 PCR 标准品, 1 为对照组, 2 为氧化型低密度脂蛋白组, 3 为肥大细胞上清液组, 4 为肥大细胞上清液+氧化型低密度脂蛋白组。

Figure 2. The expression of collagen iv and Ⅲ mRNA in SMC determined by RT-PCR

表 1. 平滑肌细胞 iv 型胶原逆转录聚合酶链反应半定量结果

Table 1. Collagen iv and Ⅲ semi-quantitative analysis results of RT-PCR

分 组	iv 型胶原	Ⅲ 型胶原
对照组	1.472	3.312
$\alpha\omega$ -LDL 组	1.338	2.635
MC 上清液组	1.135	2.512
MC 上清液+ $\alpha\omega$ -LDL 组	0.995	0.844

## 2.3 平滑肌细胞 iv 型胶原和 Ⅲ型胶原的蛋白表达

对照组 SMC 细胞浆内有大量棕色颗粒, 颗粒粗大且染色深, 说明对照组 iv 型胶原和 Ⅲ型胶原的蛋白表达为强阳性; 用  $\alpha\omega$ -LDL 或 MC 上清液分别处理 SMC 48 h 后, 细胞浆内棕色颗粒少且染色浅, 说明 iv 型胶原和 Ⅲ型胶原的蛋白表达均明显降低; 用  $\alpha\omega$ -LDL 和 MC 上清液同时处理 SMC 48 h 后, iv 型胶原和 Ⅲ型胶原的蛋白表达降低更明显(图 3, Figure 3)。

## 3 讨论

胶原是动脉粥样斑块中细胞外基质的主要成分之一, 是维持斑块稳定性的重要因素, 斑块纤维帽中胶原含量减少容易导致斑块破裂。在脉管壁中 iv 型胶原和 Ⅲ型胶原占胶原总量的 80%~90%。因此我们的实验主要从肥大细胞对 SMC iv 型胶原和 Ⅲ型胶原表达的影响入手来研究肥大细胞与斑块稳定性之间的关系。

肥大细胞来源于骨髓多潜能造血干细胞并由单核细胞分化而来, 其主要特征为胞浆内含有大量异染性颗粒, 并且在受到刺激时脱颗粒。肥大细胞被激活后, 释放胞浆分泌颗粒及一系列可溶性介质到细胞外。这些介质有三大类: 预先形成的介质, 这类介质是指预先在肥大细胞内合成, 并贮存于细胞内的颗粒中, 当变应原侵入机体后可以直接从细胞的颗粒中释放出来, 包括类胰蛋白酶、组胺、肝素蛋

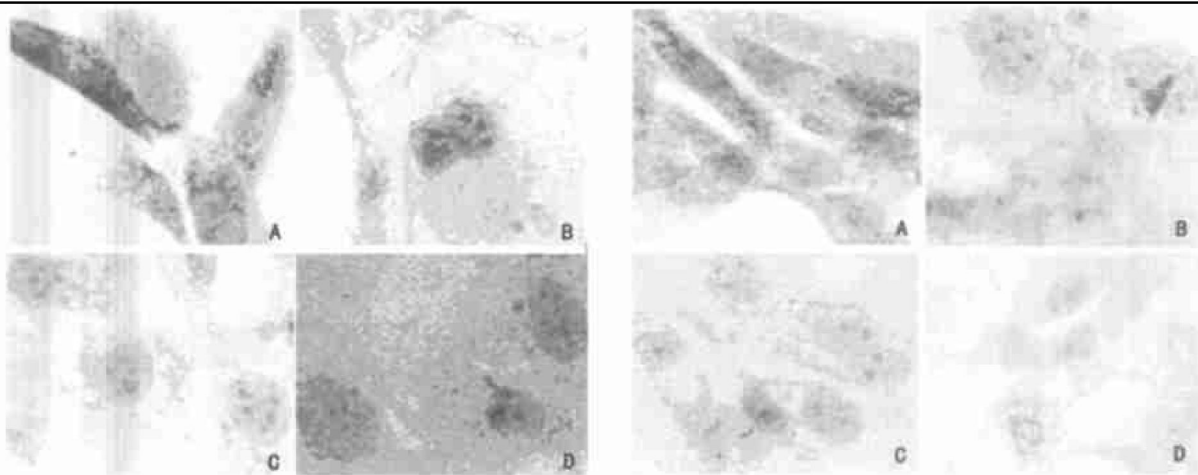


图 3. 平滑肌细胞 iv 型胶原和 Ⅰ型胶原蛋白的表达 (10×40)

左图为 iv 型胶原, 右图为 Ⅰ型胶原; A 为对照组, B 为氧化型低密度脂蛋白组, C 为肥大细胞上清液组, D 为肥大细胞上清液+ 氧化型低密度脂蛋白组。

Figure 3. The expression of collagen iv and Ⅰ protein in SMC

白聚糖、硫酸软骨素蛋白聚糖、胃促胰酶、羧肽酶等; ④新产生的介质, 这类介质是指在预先形成的介质的诱导下从肥大细胞分泌颗粒中合成后, 直接释放的或在细胞膜代谢产生的, 包括前列腺素 D<sub>2</sub> 和 E<sub>2</sub>、白三烯 C<sub>4</sub> 和 B<sub>4</sub>、血小板活化因子、血栓环素等; ⑤细胞因子, 包括 IL、TNF-α、MCP-1、GM-CSF、bFGF、VEGF、TGF-β、PDGF 等<sup>[3,4]</sup>。这些介质中的多种物质如胃促胰酶和类胰蛋白酶、组胺、TNF-α 等都可直接或间接导致胶原降解<sup>[5-7]</sup>。

我们的前期实验将 SMC 和肥大细胞共孵育, 研究发现 ox-LDL 可致大鼠腹腔肥大细胞脱颗粒, 反过来脱颗粒的肥大细胞又可加速 ox-LDL 诱导的 SMC 泡沫化, 这种作用可能与肥大细胞释放的炎症介质有关。本研究发现肥大细胞上清液可加速 ox-LDL 诱导 SMC 泡沫化, 进一步证实了肥大细胞加速 ox-LDL 诱导 SMC 泡沫化作用可能与肥大细胞释放的炎症介质密切相关。而 SMC 摄取 ox-LDL 增多可导致 SMC 合成基质金属蛋白酶增多从而降解胶原, 因此我们设想在肥大细胞加速 ox-LDL 诱导 SMC 泡沫化的过程中, SMC 表达胶原会明显降低。我们的实验结果证实了我们的设想。本实验结果发现, 肥大细胞上清液 (含肥大细胞释放的各种介质) 从 mRNA 水平和蛋白水平均抑制 SMC iv 型胶原和 Ⅰ型胶原表达, 并且能协同 ox-LDL 对 iv 型胶原和 Ⅰ型胶原表达的抑制作用。肥大细胞对胶原表达的抑制可能是肥

大细胞介质通过两种方式来发挥作用的: 第一, 肥大细胞抑制 SMC 增殖和促使 SMC 凋亡<sup>[8,9]</sup>, 我们的前期实验也发现肥大细胞可抑制 SMC 生长。第二, 肥大细胞诱导胶原降解。肥大细胞分泌的胃促胰酶和类胰蛋白酶可对胶原产生直接的水解作用, 肥大细胞的各种介质可通过激活基质金属蛋白酶水解胶原<sup>[6]</sup>。

#### [参考文献]

- [1] 唐朝克, 杨永宗, 易光辉. 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 在 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出中的作用. 中国病理生理杂志, 2003, 19 (8): 1 084-088
- [2] 郭 薇, 陈玉川, 刘水平. 一种定量检测肥大细胞脱颗粒的新方法. 上海免疫学杂志, 2002, 22 (1): 39-41
- [3] Gurish MF, Boyce JA. Mast cell growth, differentiation, and death. Clin Rev Allergy Immunol, 2002, 22 (2): 107-18
- [4] 甘 露. 肥大细胞与动脉粥样硬化. 国外医学·生理、病理科学与临床分册, 2003, 23: 277-279
- [5] Kaartinen M, van der Wal AC, van der Loos CM, Piek JJ, Koch KT, Becker AE, et al. Mast cell infiltration in acute coronary syndromes: implications for plaque rupture. J Am Coll Cardiol, 1998, 32: 606-612
- [6] Johnson JL, Jackson CL, Angelini GD, George SJ. Activation of matrix-degrading metalloproteinases by mast cell proteases in atherosclerotic plaques. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998, 18: 1 707-715
- [7] Sumi Y, Inoue N, Azumi H, Seno T, Okuda M, Hirata K, et al. Expression of tissue transglutaminase and elafin in human coronary artery: implication for plaque instability. Atherosclerosis, 2002, 160: 31-39
- [8] Wang Y, Kovanen. Heparin proteoglycans released from rat serosal mast cells inhibit proliferation of rat aortic smooth muscle cells in culture. Circ Res, 1999, 84: 74-83
- [9] Leskinen M, Wang Y, Leszczynski D, Lindstedt KA, Kovanen PT. Mast cell chymase induces apoptosis of vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21: 516-522

(此文编辑 文玉珊)