

[文章编号] 1007-3949(2006)14-07-0565-04

·实验研究·

花刺参粘多糖对大鼠血管平滑肌细胞粘附分子表达的影响

王利民, 蔡生业, 姚成芳, 王丽, 周宪宾, 王华亭, 王恒孝

(山东省医学科学院基础医学研究所, 山东省济南市 250062)

[关键词] 病理学与病理生理学; 花刺参粘多糖; 血管平滑肌细胞; 粘附分子; 单核细胞; 大鼠; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 观察花刺参粘多糖对肿瘤坏死因子 α 诱导的大鼠血管平滑肌细胞血管细胞粘附分子1和细胞间粘附分子1表达的影响,以探讨花刺参粘多糖抗动脉粥样硬化的可能机制。方法 组织贴块法体外原代培养大鼠血管平滑肌细胞,采用流式细胞术、逆转录聚合酶链反应和细胞粘附实验方法,观察花刺参粘多糖对肿瘤坏死因子 α 诱导的平滑肌细胞血管细胞粘附分子1、细胞间粘附分子1蛋白及mRNA水平表达及单核细胞与平滑肌细胞粘附的影响。结果 肿瘤坏死因子 α 刺激后平滑肌细胞血管细胞粘附分子1和细胞间粘附分子1表达增强,花刺参粘多糖(1.5~6.0 g/L)可从蛋白和mRNA水平浓度依赖性地抑制其表达,流式细胞分析示血管细胞粘附分子1的荧光强度由 176.4 ± 3.5 减少到 80.7 ± 1.9 ($P < 0.01$),细胞间粘附分子1的荧光强度由 92.2 ± 2.9 减少到 58.3 ± 2.1 ($P < 0.01$);逆转录聚合酶链反应结果发现血管细胞粘附分子1的相对光密度值由 0.61 ± 0.03 减少到 0.41 ± 0.04 ($P < 0.01$),细胞间粘附分子1的相对光密度值由 0.41 ± 0.01 减少到 0.30 ± 0.03 ($P < 0.05$);粘附实验发现花刺参粘多糖可减少单核细胞与平滑肌细胞粘附,光密度值由 0.467 ± 0.062 减少到 0.256 ± 0.029 ($P < 0.05$)。结论 花刺参粘多糖可抑制肿瘤坏死因子 α 诱导的平滑肌细胞血管细胞粘附分子1和细胞间粘附分子1的表达,减少单核细胞与平滑肌细胞的粘附和聚集,这可能对减轻血管壁的炎症反应、延缓动脉粥样硬化发生发展起一定作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Stichopus Variegates on Expression of Adhesion Molecules in Rat Vascular Smooth Muscle Cells

WANG Li-Min, CAI Sheng-Ye, YAO Cheng-Fang, WANG Li, ZHOU Xian-Bin, WANG Hua-Ting, and WANG Heng-Xiao
(Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China)

[KEY WORDS] Stichopus Variegates; Vascular Smooth Muscle Cell; Adhesion Molecules; Monocyte; Rats; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of Stichopus Variegates on tumor necrosis factor- α (TNF- α) that induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in rat vascular smooth muscle cells (VSMC), and to explore the mechanism of anti-atherosclerosis role of Stichopus Variegates. **Methods** VSMC were isolated from the media of normal rat thoracic aorta, VCAM-1 and ICAM-1 protein and mRNA expression were detected by flow cytometric technique and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) respectively. Adhesion of monocytes to VSMC was measured by cell adherence assay. **Results** Under basal conditions of cultivation, both mRNA and protein expression of VCAM-1 and ICAM-1 in VSMC were very low. Treatment of VSMC with TNF- α (10 μ g/L) led to a markedly increase in both VCAM-1 and ICAM-1 expression ($P < 0.01$). Stichopus Variegates (1.5~6.0 g/L) significantly inhibited TNF- α induced protein and mRNA expression of VCAM-1 and ICAM-1. Flow cytometry showed mean fluorescence intensity of VCAM-1 decreased from 176.4 ± 3.5 to 80.7 ± 1.9 ($P < 0.01$), ICAM-1 decreased from 92.2 ± 2.9 to 58.3 ± 2.1 ($P < 0.01$); Relative optical density of VCAM-1 decreased from 0.61 ± 0.03 to 0.41 ± 0.04 analyzed by RT-PCR ($P < 0.01$), ICAM-1 decreased from 0.41 ± 0.01 to 0.30 ± 0.03 ($P < 0.05$). Cell adherence assay showed that Stichopus Variegates effectively reduced monocytes adhesion to VSMC, OD value decreased from 0.467 ± 0.062 to 0.256 ± 0.029 ($P < 0.05$). **Conclusion** Stichopus Variegates inhibited TNF- α induced expression of VCAM-1, ICAM-1 and adherence of monocyte to VSMC, which may play important roles in the prevention of atherosclerosis and inflammatory response in vivo.

许多研究表明,运用药物抑制粘附分子的表达, 粥样硬化(atherosclerosis, As)和再狭窄的形成。花刺参可有效防治和减轻局部炎症反应,从而减少动脉粥样硬化中所含的有效成分酸性粘多糖,具有抗肿瘤、降血

[收稿日期] 2005-09-19

[修回日期] 2006-06-26

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30271674),山东省自然科学基金资助项目(Y2002C43)

[作者简介] 王利民,硕士研究生,从事冠心病研究,E-mail为 wangliminpy@yahoo.com.cn。通讯作者蔡生业,研究员,硕士研究生导师,主要从事中西医结合基础研究,E-mail为 shycal2@163.com.cn。姚成芳,博士,研究员,硕士研究生导师,主要从事中药免疫和中西医结合基础研究。

压和抗凝血等作用。我们采用特殊工艺成功提取了花刺参粘多糖^[1], 以往研究证实, 复方花刺参粘多糖明显降低大鼠血清总胆固醇和甘油三酯, 能抑制损伤后血管重塑, 保护血管内皮, 减轻内膜增生及管腔狭窄, 可减轻粥样斑块的发生发展^[2,3], 但花刺参粘多糖对血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)表达血管细胞粘附分子 1(vascular cell adhesion molecular-1, VCAM-1)、细胞间粘附分子 1(inter-cellular adhesion molecular-1, ICAM-1)的影响未见报道, 本文对此进行研究, 以进一步探讨其抗 As 机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

健康雄性 Wistar 大鼠 10 只, 体重 100~120 g, 购于山东大学实验动物中心。DMEM 培养基为美国 Invitrogen 公司生产, 胎牛血清为杭州四季青生物公司生产。花刺参粘多糖由本室制备, 纯度达 99%。总 RNA 提取及聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)试剂购于 Fermentas 公司。Recombinant Rat 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 为美国 R&D 公司产品。FITC 标记 mouse anti-rat ICAM-1 单克隆抗体为英国 Serotech 公司产品, PE 标记 mouse anti-rat-VCAM-1 单克隆抗体为美国 Biotend 公司产品。Rose Bengal 购于美国 Sigma 公司。

1.2 细胞培养与鉴定

无菌条件下取 Wistar 大鼠(每次 2 只)胸主动脉, 组织贴块法培养平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC), 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中静止培养, 待其基本汇合后用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。培养的 VSMC 经形态学和 SM- α -actin 免疫荧光法鉴定, 相差显微镜下, 细胞呈长梭形, 成束的细胞平行排列, 细胞基本汇合时呈现 SMC 特征性的“峰”、“谷”状生长。SM- α -actin 免疫荧光法鉴定阳性 VSMC 大于 95%, 纯度符合实验要求。取生长稳定的 5~10 代细胞用于实验。

1.3 实验细胞分组

细胞均按 2×10^5 /L 的密度接种于培养板中, 待细胞约 90% 汇合时, 换含 0.5% 胎牛血清的 DMEM 培养基饥饿 24 h 使细胞同步化, 然后用含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养基继续培养, 取生长良好 VSMC 随机分为(每组样本数为 3 个)空白对照组、TNF- α 刺激组(10 μ g/L)和 TNF- α 不同浓度(1.5、3.0、6.0 g/L)花刺参粘多糖组, 空白对照组未加任何干预因素。继续孵育 24 h 后进行以下检测。

1.4 流式细胞仪测定

将上述分组与用药的细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, PBS 收集细胞, 分别加入 10 μ L PE 标记 mouse anti-rat-VCAM-1 和 10 μ L FITC 标记 mouse anti-rat-ICAM-1 单克隆抗体重悬细胞, 冰上避光孵育 30 min, PBS 洗两次, 离心弃上清, 0.7 mL PBS 重悬细胞, 流式细胞仪检测其平均荧光强度。

1.5 逆转录聚合酶链反应

细胞总 RNA 提取: 采用异硫氰酸胍一酚一氯仿一步法提取细胞总 RNA, 用 751 分光光度计鉴定纯度并定量。④逆转录: 取 2 μ g 总 RNA, 随机引物 1 μ L (1 μ g), 5 \times RT 缓冲液 8 μ L, dNTP 4 μ L (10 mmol/L), RNA 酶抑制剂 2 μ L (40 u), M-MLV 2 μ L (400 u), 补水至总体积 40 μ L, 42 °C 1 h, 70 °C 10 min。④PCR: 反应体系为 10 \times Buffer 5 μ L, MgCl₂ 4 μ L, dNTP 1 μ L, 上、下游引物各 1 μ L (25 pmol), Tag 酶 1 μ L (5 u), 补水至 50 μ L。反应条件为 95 °C 预变性 5 min 后, 94 °C 变性 1 min \rightarrow 58 °C 退火 1 min \rightarrow 72 °C 延伸 1 min, 共 26 个循环, 末次循环后 72 °C 延伸 10 min。引物由上海生物工程公司合成, ICAM-1 引物序列上游为 5'-TCA AAC GGG AGA TGA ATG G-3', 下游为 5'-CTG GCG GTA ATA GGT GTA AAT-3', 扩增长度 185 bp; VCAM-1 引物序列上游为 5'-ACT GCA CGG TCC CTA ATG-3', 下游为 5'-TCC CTC TTT GAC GCT CTT-3', 扩增长度 561 bp; 内参照 β -actin 引物序列上游为 5'-TCG TGC GTG ACA TTA AAG AG-3', 下游为 5'-CCA GGA TAG AGC CAC CAA T-3', 扩增长度 417 bp。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶(EB 染色)电泳, DNA Marker 为 Promega 公司产品。用凝胶成像系统分析仪(美国 Alpha Imager2200)观察并摄片。

1.6 单核细胞—血管平滑肌细胞粘附实验

实验方法参照文献[4]。接种于 96 孔板生长良好的 VSMC 按上述分组及用药后, 各组弃培养基, PBS 洗细胞两次, 每孔加入浓度为 2.5×10^6 /L 单核细胞悬液 200 μ L, 粘附 30 min, 吸除未粘附的单核细胞, PBS 洗涤两遍, 每孔加入 100 μ L 0.25% Rose Bengal, 室温作用 5 min, 吸除染料, PBS 洗孔两遍, 每孔加入 PBS-乙醇(1:1) 200 μ L, 室温作用 30 min 后, 酶标仪 570 nm 波长下测定各孔 OD 值。

1.7 细胞活力实验

细胞活力试验采用台盼蓝染色、细胞计数方法, 结果发现本研究所用浓度的花刺参粘多糖对 VSMC 生长无任何毒性, 细胞存活力达 96% 以上。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均数间比较用方差分析。

2 结果

2.1 流式细胞仪检测结果

空白对照组 VCAM-1 和 ICAM-1 表达均很弱, 10 $\mu\text{g/L}$ TNF- α 作用 24 h 可显著诱导大鼠 VSMC 表达 VCAM-1(增加约 5 倍)和 ICAM-1(增加约 3 倍) ($P < 0.01$), 而花刺参粘多糖可明显抑制 TNF- α 诱导的 VSMC 表达 VCAM-1 和 ICAM-1 ($P < 0.01$), 且随浓度增加, 其抑制作用增强 ($P < 0.01$) (表 1)。

表 1. 花刺参粘多糖对肿瘤坏死因子 α 诱导的血管平滑肌细胞粘附分子表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	VCAM-1	ICAM-1
空白对照组	35.4 \pm 2.3	33.9 \pm 1.7
TNF- α 刺激组	176.4 \pm 3.5 ^a	92.2 \pm 2.9 ^a
花刺参粘多糖 1.5 g/L 组	132.1 \pm 2.0 ^b	71.5 \pm 1.6 ^b
花刺参粘多糖 3.0 g/L 组	122.6 \pm 2.5 ^b	66.2 \pm 1.1 ^b
花刺参粘多糖 6.0 g/L 组	80.7 \pm 1.9 ^b	58.3 \pm 2.1 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与肿瘤坏死因子 α 刺激组比较。

2.2 逆转录聚合酶链反应结果

空白对照组 VCAM-1 和 ICAM-1 mRNA 表达甚微, 10 $\mu\text{g/L}$ TNF- α 可诱导 VCAM-1 和 ICAM-1 mRNA 表达 ($P < 0.01$), 花刺参粘多糖则明显抑制 TNF- α 诱导的 VCAM-1 和 ICAM-1 mRNA 表达 ($P < 0.05$ 或 0.01), 但各浓度组间差异无显著性 (表 2 及图 1)。

2.3 花刺参粘多糖对肿瘤坏死因子 α 诱导的血管平滑肌细胞—单核细胞粘附的影响

空白对照组只有少量单核细胞与 VSMC 粘附 ($\text{OD}_{570\text{nm}}$ 为 0.148 \pm 0.032), TNF- α 刺激组单核细胞与

VSMC 粘附显著增加 ($\text{OD}_{570\text{nm}}$ 为 0.467 \pm 0.062, $P < 0.01$), 花刺参粘多糖能抑制单核细胞与 VSMC 粘附 (1.5、3.0、6.0 g/L 组 $\text{OD}_{570\text{nm}}$ 分别为 0.383 \pm 0.052、0.327 \pm 0.029、0.256 \pm 0.029, $P < 0.05$ 或 0.01), 且随浓度增加, 其抑制作用增强 ($P < 0.01$, 图 2)。

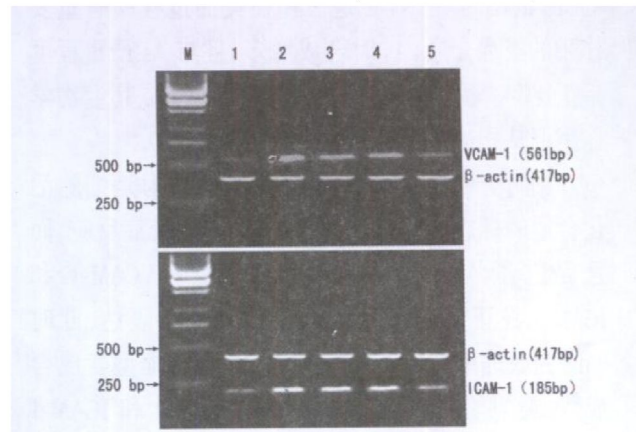


图 1. 逆转录聚合酶链反应结果 M 为相对分子质量, 1 为空白对照组, 2 为肿瘤坏死因子 α 刺激组, 3 为花刺参粘多糖 1.5 g/L 组, 4 为花刺参粘多糖 3.0 g/L 组, 5 为花刺参粘多糖 6.0 g/L 组。

表 2. 花刺参粘多糖对肿瘤坏死因子 α 诱导的血管平滑肌细胞粘附分子 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	VCAM-1/ β -actin	ICAM-1/ β -actin
空白对照组	0.30 \pm 0.02	0.25 \pm 0.02
TNF- α 刺激组	0.61 \pm 0.03 ^a	0.41 \pm 0.01 ^a
花刺参粘多糖 1.5 g/L 组	0.49 \pm 0.03 ^c	0.37 \pm 0.02 ^b
花刺参粘多糖 3.0 g/L 组	0.46 \pm 0.03 ^c	0.35 \pm 0.01 ^b
花刺参粘多糖 6.0 g/L 组	0.41 \pm 0.04 ^c	0.30 \pm 0.03 ^c

a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与肿瘤坏死因子 α 刺激组比较。

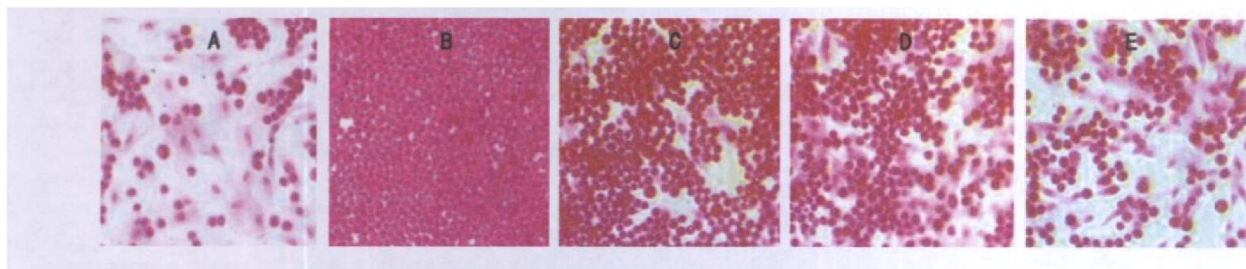


图 2. 花刺参粘多糖对单核细胞与平滑肌细胞粘附的影响 ($\times 100$) A 为空白对照组, B 为肿瘤坏死因子 α 刺激组, C、D、E 分别为花刺参粘多糖 1.5、3.0、6.0 g/L 组。

3 讨论

粘附分子是一类介导细胞与细胞间或细胞与细胞外基质间相互作用的膜表面糖蛋白, 广泛分布于体内, 由其介导的细胞间的粘附和迁移在冠状动脉粥样硬化的形成和发展、经皮腔内冠状动脉成形术

后再狭窄、血管移植等疾病中发挥了重要作用。参与 As 发生发展的粘附分子主要有整合素家族、免疫球蛋白超家族和选择素家族, ICAM-1 和 VCAM-1 均属于免疫球蛋白超家族成员。文献报道, 一些细胞因子如 TNF- α 、 γ 干扰素、白细胞介素 1 等均可促进

SMC 表达 ICAM-1 和/或 VCAM-1^[5], 其中 TNF- α 的作用尤其引人注目。本实验结果证实, 不论从蛋白水平还是 mRNA 水平, TNF- α 均能显著诱导大鼠 VSMC 表达 VCAM-1 和 ICAM-1, 并能增加单核细胞与 VSMC 的粘附。TNF- α 是一种在炎症过程中有重要作用的炎症介质, As 时合成增多, 且与 As 严重程度呈正比^[6]。因此, 抑制它们的释放或拮抗其生物学作用可从相应环节起到抗 As 的效果^[7]。

粘附分子 VCAM-1 和 ICAM-1 被认为是细胞活化合适的标志物, 不仅仅介导和助长了炎症反应, 而且促进了 VSMC 的增殖和迁移^[8]。VCAM-1 和 ICAM-1 在正常成人主动脉 SMC 基本不表达, 此时 SMC 为收缩型; 当发生 As 时, SMC 由收缩型变成合成型, 类似于胎儿的 SMC, 这时 VCAM-1 和 ICAM-1 又重新表达, 它们的表达被认为是细胞表型变化和胎儿基因再表达的标志。Li 等^[9] 研究发现, As 形成早期, VCAM-1 主要表达于内皮细胞, 而在进展性纤维斑块, VCAM-1 主要表达于 SMC 尤其是新生内膜中的 SMC, 当斑块成熟, 动脉腔面内皮表达 VCAM-1 呈最低水平或消失。在病变形成早期, VCAM-1 和 ICAM-1 主要促进单核细胞向内皮细胞粘附、迁移, 在进展期病变, 则促进已潜入病灶的单核细胞积聚、T 淋巴细胞激活, 并增加其他细胞与细胞间的相互作用。本实验利用流式细胞术和 RT-PCR 首次观察了花刺参粘多糖对 TNF- α 诱导的 VSMC 粘附分子 VCAM-1 和 ICAM-1 表达的影响, 从蛋白和 mRNA 水平验证了花刺参粘多糖对 VSMC 粘附分子的表达具有抑制作用, 尤其对 VCAM-1 的抑制作用更显著, 且其抑制作用具有浓度依赖性, 这对延缓 As 的发生发展、稳定斑块、减轻局部炎症反应有一定作用, 说明花刺参粘多糖具有临床开发前景。

单核细胞在 As 发生发展中起重要作用。机体正常状态下, 单核细胞与 VSMC 接触较少, 一旦单核细胞穿过内皮便会与内膜、中膜中 SMC 直接接触, 另外在 As 破裂或医源性损伤后, SMC 被暴露到循环血液中和单核细胞直接接触, 介导单核细胞向斑块的招募和粘附, 一方面单核细胞摄取斑块处大量氧化低密度脂蛋白转变为泡沫细胞; 另一方面, 单核细胞释放的细胞因子和有丝分裂原刺激 SMC 表型转化和增殖并进一步向内膜迁移。SMC 介导的单核细胞招募不仅有利于炎症反应的继续发展, 而且刺激了 SMC 的增殖和细胞外基质的合成, 导致斑块的进展和血管损伤局部的再狭窄。有研究表明^[10],

VSMC 可通过 VCAM-1 逆转无血清培养基诱导的单核细胞凋亡, SMC 与单核细胞联合培养可增加单核细胞 CD36 表达, CD36 属于 B 类清道夫受体, 是促 As 脂质的主要受体。Zhu 等^[11] 在体外实验中证实, 单核细胞与 SMC 之间的相互作用增加了基质金属蛋白酶 1 的产生, 后者能促进斑块破裂、引发急性冠状动脉综合征。这些结果表明, VSMC 与单核细胞接触绝不仅是简单的共存关系, 二者的粘附和相互作用对 As 的发生发展都有促进作用。因此, 运用药物抑制二者的粘附具有重要意义。

本研究发现, SMC 未经诱导时与单核细胞粘附量很少, 经 TNF- α 刺激后, 与单核细胞粘附量大为增加, 随着花刺参粘多糖浓度的增加, 对 VCAM-1 和 ICAM-1 抑制作用增强, 单核细胞的粘附量逐渐减少, 说明花刺参粘多糖可通过抑制平滑肌细胞 VCAM-1 和 ICAM-1 特别是 VCAM-1 的表达而阻止单核细胞的粘附。然而, 有关花刺参粘多糖抑制 TNF- α 诱导 VSMC 表达 VCAM-1 和 ICAM-1 的确切机制还有待进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] 孙怀玉, 胡志力, 卢霞, 孙敏跃, 王秀丽, 朱晨, 等. 花刺参中酸性粘多糖的提取及纯化研究[J]. 山东中医药大学学报, 1999, 23 (2): 145-146
- [2] 朱宗涛, 蔡生业, 姚成芳, 王丽, 王华亭, 张维东. 复方花刺参粘多糖对大鼠动脉内皮剥脱家兔内膜增生的影响及机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (1): 43-46
- [3] 王华亭, 蔡生业, 姚成芳, 王丽, 朱宗涛, 张维东. 复方花刺参粘多糖对家兔血管成形术后内皮功能及超微结构的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (5): 497-501
- [4] Theriault A, Chao JF, Gapor A. Tocotrienol is the most effective vitamin E for reducing endothelial expression of adhesion molecules and adhesion to monocytes [J]. *Atherosclerosis*, 2002, 160 (1): 21-30
- [5] Braun M, Pietsch P, Felix SB, Baumann G. Modulation of intercellular adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1 on human coronary smooth muscle cells by cytokines [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, 27 (12): 2 571-579
- [6] 梁萍, 孙雷, 唐建武, 王羽中. 细胞间粘附分子 1、血管细胞粘附分子 1 和肿瘤坏死因子 α 在人动脉粥样硬化病灶中的表达及意义[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (4): 427-429
- [7] Branan L, Hovgaard L, Nitulescu M, Bengtsson E, Nilsson J, Jovinge S. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24 (11): 2 137-142
- [8] Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease [J]. *New Eng J Med*, 1999, 340 (2): 115-126
- [9] Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, Libby P. Inducible expression of vascular cell adhesion molecule-1 by vascular smooth muscle cells in vitro and within rabbit atheroma [J]. *Am J Pathol*, 1993, 143 (6): 1 551-559
- [10] Cai Q, Lanting L, Natarajan R. Interaction of monocytes with vascular smooth muscle cells regulates monocyte survival and differentiation through distinct pathways [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24 (12): 2 263-270
- [11] Zhu Y, Hojo Y, Ikeda U, Takahashi M, Shimada k. Interaction between monocytes and vascular smooth muscle cells enhances matrix metalloproteinase 1 production [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2000, 36 (2): 152-161

(此文编辑 许雪梅)