

巨噬细胞移动抑制因子促进新生微血管生成

蔡施霞^{1,2}, 余细勇², 林秋雄², 单志新², 符永恒²

(1. 广东医学院附属医院, 广东省湛江市 524023;

2. 广东省人民医院医学研究中心 广东省心血管病研究所, 广东省广州市 510080)

[关键词] 病理学; 新生微血管生成; 巨噬细胞移动抑制因子; 血管内皮细胞; 细胞增殖

[摘要] 目的 观察巨噬细胞移动抑制因子对体外培养的人血管内皮细胞增殖的作用, 以及通过体内外血管生成实验证实巨噬细胞移动抑制因子促进新生微血管生成的作用。方法 采用体外培养的人血管内皮细胞株 EAhy926 为实验对象, 通过四甲基偶氮唑盐比色法测定血管内皮细胞增殖; 利用体外血管生成分析试剂盒量化分析巨噬细胞移动抑制因子在体外对新生微血管生成的作用; 利用免疫组织化学染色法检测巨噬细胞移动抑制因子作用后基底膜类似物栓子中第(Ⅰ)因子相关抗原观察巨噬细胞移动抑制因子在小鼠体内对新生微血管生成的作用。结果 巨噬细胞移动抑制因子可以促进体外培养的人血管内皮细胞增殖, 促进体外培养的人血管内皮细胞在体外形成血管腔, 在小鼠体内也能促进基底膜类似物栓子中新生微血管生成。结论 巨噬细胞移动抑制因子有促进新生微血管生成的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Experimental Study of Neovascularization Induced by Macrophage Migration Inhibitory Factor

CAI Shi-Xia^{1,2}, YU Xi-Yong², LIN Qiu-Xiong², SHAN Zhi-Xin², and FU Yong-Heng²

(1. Affiliated Hospital of Guangdong Medical College; 2. Research Center of Medical Sciences, Guangdong Provincial People's Hospital; Guangdong Provincial Cardiovascular Institute, Guangzhou 510080; China)

[KEY WORDS] Macrophage Migration Inhibitory Factor; Neovascularization; Vascular Endothelial Cells; Cell Proliferation; Atherosclerotic Plaque

[ABSTRACT] **Aim** To observe the role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in proliferation of the human vascular endothelial cell line, EAhy926, cultured in vitro and the angiogenesis assay in vitro and vivo to prove that MIF could promote neovascularization. **Methods** Endothelial cell proliferation promoted by MIF was detected by MTT colorimetric assay. Angiogenesis in vitro was detected by ECMatrix gel, a numerical value was associated with a degree of angiogenesis progression. Angiogenesis in vivo was detected by the factor (Ⅰ) immunohistochemical staining, with injecting the matrigel plug in BALB/c Mice.

Results MIF could promote the human endothelial cell proliferation, stimulate the tube formation of endothelial cells in vitro, and promote the blood vessels formation in matrigel plug in vivo. **Conclusion** Macrophage migration inhibitory factor plays a specific role in promoting neovascularization.

巨噬细胞移动抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) 能够抑制巨噬细胞游走, 引起巨噬细胞在迟发型变态反应中浸润、聚集。MIF 参与了多种自身免疫和炎症疾病的病理过程^[1,2]。不仅仅是免疫细胞、垂体促肾上腺皮质细胞能产生 MIF, 在动脉粥样硬化中起关键作用的血管内皮细胞、血管平滑肌细胞在炎症和损伤的刺激下也能产生 MIF, 并且在不同阶段、不同时期有不同程度的表

达, 从而产生不同程度的 MIF 免疫反应影响斑块的稳定性^[3]。近期研究发现, 阻断 MIF 活性可使动脉粥样硬化斑块的细胞组成向稳定型转化^[4]。有报道指出 MIF 可能是潜在的内皮细胞生长促进剂, 并能显著提高肿瘤生长及与之关联的血管的发生^[5]。在体外, MIF 可以诱导人皮肤微血管内皮细胞在基底膜类似物 (matrigel) 中的细胞移动和管腔形成。在体内, 可以诱导基底膜类似物栓子 (Matrigel plugs) 和角膜生物测定中的血管生成^[6]。由于血管生成与粥样硬化斑块的不稳定性有关^[7], 为了研究 MIF 是否通过促进血管生成影响斑块的稳定性, 本实验采用体外培养的人血管内皮细胞株为研究对象, 观察 MIF 对新生微血管形成的作用。

[收稿日期] 2006-07-18 [修回日期] 2006-11-01

[基金项目] 广东省自然科学基金团队项目 (015015) 资助

[作者简介] 蔡施霞, 医学硕士, 主要研究方向为细胞因子与斑块稳定性, E-mail 为 cccsxxx1980@163.com。通讯作者余细勇, 研究员, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为分子心血管病学, E-mail 为 yuxycn@hotmail.com。林秋雄, 主任技师, 主要研究方向为细胞生物与病理学。

1 材料和方法

1.1 材料

人血管内皮细胞株 EAhy926^[8] 由广东省人民医院医学研究中心保存。BALB/c 小鼠购自岭南实验动物中心, 雄性, 体重 25 ± 3 g。DMEM/F12 (Gibco-BRL) 加入 100 kIU/L 青霉素、100 mg/L 链霉素及终浓度 10% 胎牛血清 (GibcoBRL), 0.25% 胰蛋白酶、重组人 MIF 购自 R&D 公司, 四甲基偶氮唑盐 (MTT)、二甲基亚砜 (DMSO) 购自 Sigma Chemical 公司, 体外血管生成分析试剂盒购自 Chemicon 公司, BD Matrigel Basement Membrane Matrix 购自 Becton Dickson 公司, 第 (D) 因子抗体、生物素标记的羊抗鼠第二抗体购自福州迈新公司。

1.2 内皮细胞的复苏和传代培养

人血管内皮细胞株 EAhy926 为贴壁生长细胞, 用含 100 kIU/L 青霉素、100 mg/L 链霉素及 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养, 自液氮中取出冻存管, 立即放入 37℃ 水槽中快速解冻 (1 min 内), 5 min 内用培养液稀释至原体积的 10 倍以上, 1 000 r/min 离心 3 min 后, 去上清, 加入 5 mL 培养液重新悬浮细胞, 在 T-25 培养瓶中于 5% CO₂、37℃ 恒温箱中培养, 隔日更换培养基。待细胞生长至基本汇合时进行传代, 吸掉旧培养液, PBS 洗涤 2 次, 加入 0.25% 胰蛋白酶 3 mL, 37℃ 作用 3~5 min, 于倒置显微镜下观察, 当细胞将要分离而呈现圆粒状时, 加入适量血清终止胰蛋白酶消化作用, 1 000 r/min 离心 3 min 后, 吸掉上清液, 加入适量新鲜培养液打散细胞团块, 混合均匀后, 按比例转移至新的培养瓶中, 以正常培养条件培养。

1.3 四甲基偶氮唑盐比色法测定内皮细胞增殖

内皮细胞以 2×10^7 /L 的密度接种于 96 孔培养板, 培养 24 h 达 70%~80% 汇合后, 随机分组, 每组设 6 个平行孔, 分为空白对照组和 MIF 10 μg/L、25 μg/L 和 50 μg/L 组。处理前换成无血清 DMEM 培养基培养 24 h, 然后分别加入上述浓度的 MIF 继续培养 48 h, 加入 MTT 溶液 (5 g/L) 20 μL/孔, 37℃ 继续孵育 4 h, 吸去上清液, 每孔加入 100 μL DMSO, 振荡 10 min。选择 490 nm 波长, 在酶标仪上测定各孔吸光值 (A 值)。各孔吸光值与孔内细胞数量呈正相关, 并计算增殖率 (%) = (阳性组 A 值 - 对照组 A 值) ÷ 对照组 A 值 × 100%。

1.4 巨噬细胞移动抑制因子促进新生微血管生成的体外实验

将 -20℃ 保存的 ECMatrix 胶溶液及稀释缓冲液

在预先制备的冰上冻融, 然后按 1:10 的比例稀释, 以 50 μL/孔铺 96 孔板, 随机分成阴性对照组 (BSA 组)、阳性对照组 (VEGF 组) 和 MIF 25 μg/L、50 μg/L、100 μg/L 组, 每组设 4 个平行孔。37℃ 放置 1 h 使胶凝固。将 150 μL 密度为 1×10^7 /L 的内皮细胞铺在凝胶上, 分别用 2 μg/L BSA、2 μg/L VEGF 及 25 μg/L、50 μg/L 和 100 μg/L MIF 处理细胞 10 h。显微镜下拍照, 记录结果, 在每个孔中随机取三个视野, 根据测试盒操作指南进行评分, 评分标准: 0 分为单个细胞, 完全分散; 1 分为细胞开始移动并连成线; 2 分为毛细血管腔形成, 但未出芽; 3 分为出芽的毛细血管腔形成; 4 分为闭合的多边形开始形成; 5 分为复杂的血管网状结构形成。

1.5 巨噬细胞移动抑制因子促进新生微血管生成的体内实验

将 10 只 BALB/c 小鼠随机分成 PBS 对照组和 MIF 组。于 4℃ 将 0.5 mL Matrigel 和 62.5 u 肝素及与 PBS 或终浓度为 50 μg/L MIF 混合后, 取 1 mL 注射入 BALB/c 小鼠腹白线皮下, 注射后 Matrigel 在皮下迅速聚合成单一的固体胶, 10 天后乙醚麻醉小鼠, 70% 酒精消毒小鼠腹部皮肤, 沿腹白线剪开皮肤, 剥离出胶块, 经 10% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋, 切片, 用免疫组织化学法检测第 (D) 因子相关抗原, 微血管密度的测定按 Weidner^[9] 报道的方法进行。内皮细胞形成明显管腔计数为一个血管, 每张切片在 200× 放大倍数下, 随机取 3 个视野, 计数每个视野中血管个数, 其平均值为微血管密度。

1.6 统计学方法

采用 SPSS10.0 统计软件。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 多组间比较采用 Newman-Keuls' a 检验, 两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 内皮细胞的鉴定

倒置相差显微镜下, 刚复苏的内皮细胞呈球形, 培养 4~6 h 细胞开始贴壁生长, 初为圆形或椭圆形, 后变为梭形, 细胞在瓶壁逐渐展开、伸出伪足, 变为类圆形或多角形等形态; 12 h 细胞基本贴壁, 呈单层铺路石样排列, 第 2~3 天基本汇合, 细胞中央有明显椭圆形细胞核, 常常有 2~5 个核仁, 无重叠生长现象 (图 1)。复苏培养的内皮细胞在传代的前 3~5 代无论细胞形态还是细胞活力都良好, 在此期间可进行实验研究。

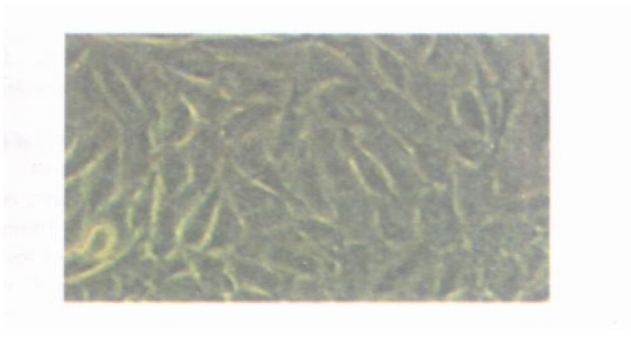


图 1. 复苏培养 2 天的人血管内皮细胞株

2.2 巨噬细胞移动抑制因子对内皮细胞的促增殖作用

与空白对照组比较, 10、25 及 50 $\mu\text{g/L}$ MIF 对体外培养的人血管内皮细胞均有促增殖作用, 且随着浓度的递增增殖率逐渐增加 ($P < 0.05$; 表 1)。

表 1. 巨噬细胞移动抑制因子对内皮细胞增殖率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	增殖率
空白对照组	0
MIF 10 $\mu\text{g/L}$	0.118% \pm 0.016% ^a
25 $\mu\text{g/L}$	0.153% \pm 0.022% ^b
50 $\mu\text{g/L}$	0.254% \pm 0.036% ^c

a 为 $P < 0.05$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 10 $\mu\text{g/L}$ 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 10 $\mu\text{g/L}$ 组和 25 $\mu\text{g/L}$ 组比较。

2.3 巨噬细胞移动抑制因子促进新生微血管生成的体外实验

阴性对照组 (BSA 组) 内皮细胞散在分布, 未聚集成管腔结构, 而阳性对照组 (VEGF 组) 和不同浓度 MIF 处理组内皮细胞能聚集成明显的管腔结构 (图 2)。与阴性对照组比较, 25、50 和 100 $\mu\text{g/L}$ MIF 组评分增加, 且随着浓度的递增评分逐渐增加 ($P < 0.05$; 表 2)。

表 2. 巨噬细胞移动抑制因子促进血管管腔形成的量化评价 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

分 组	评分
阴性对照组	0.917 \pm 0.319
阳性对照组	2.667 \pm 0.272 ^a
MIF 25 $\mu\text{g/L}$	2.333 \pm 0.272 ^{bc}
50 $\mu\text{g/L}$	3.000 \pm 0.272 ^{bc}
100 $\mu\text{g/L}$	4.250 \pm 0.319 ^{abc}

a 为 $P < 0.05$, 与阴性对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与阳性对照组比较; c 为 $P < 0.05$, MIF 三个浓度组间比较。



图 2. 巨噬细胞移动抑制因子促进人血管内皮细胞体外管腔样结构的生成 A 为阴性对照组, B 为阳性对照组, C 为 50 $\mu\text{g/L}$ 巨噬细胞移动抑制因子组。

2.4 巨噬细胞移动抑制因子促进新生微血管生成的体内实验

肉眼观察发现 MIF 组 matrigel plugs 出现明显血管丛, 类似血管瘤样物, 而对照组只发现少许发丝样血管。第 II 因子相关抗原免疫组织化学染色发现, 对照组迁移入的内皮细胞散在, 几乎无血管形成, 而 MIF 组可以见到典型的血管结构, MIF 组微血管密度 (6.067 ± 1.581) 明显多于阴性对照组 (0.333 ± 0.236 , $P < 0.01$; 图 3)。

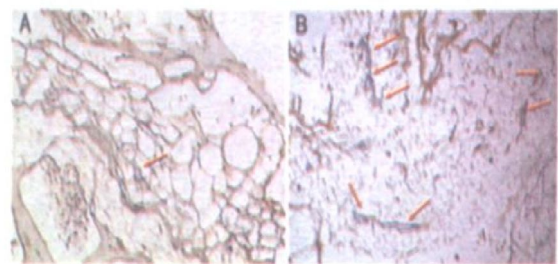


图 3. 巨噬细胞移动抑制因子促进小鼠皮下 matrigel plugs 中血管生成 (20 \times) A 为对照组, B 为 50 $\mu\text{g/L}$ 巨噬细胞移动抑制因子组。箭头所示为血管。

3 讨论

血管新生是指原有微血管内皮细胞经过生芽、迁移、增殖与基质重塑等过程产生新血管的过程。内皮细胞是新生微血管生成必不可少的, 本研究所采用的细胞株为人内皮源细胞系 EAhy926, 是由人

内皮细胞和 A549/8 细胞杂交而得到的一种永久细胞, 具有稳定的内皮特性, 并保持不断分裂的能力。

Yang 等^[10]报道重组人 MIF 在很低浓度(0.1 ng/L)就能促进内皮细胞增殖, 并呈剂量依赖性, MIF 在体内外对肿瘤生长相关的血管生成起很重要的作用, 以自分泌调节的形式促进微血管内皮细胞增殖^[11]。本研究证实了 MIF 这一作用。血管内皮细胞形成小管样结构是新生血管的必然过程, 血管管腔形成是一个多步骤的过程, 包括细胞粘附、迁移、分化和生长。在损伤修复和肿瘤生长过程中 MIF 不仅与免疫反应有关, 还参与了细胞增殖和分化^[12], MIF 在人转移性结肠癌中和转移性前列腺癌中都有高表达, 在后者, 巨噬细胞和肿瘤细胞间的相互作用表明起促进血管形成和组织增殖^[13]。已发现组织损伤后, MIF 在人血管内皮细胞、角膜内皮及上皮细胞都能被检测到, 说明 MIF 具有组织修复和细胞增殖的作用。这些资料我们的结果一致, 表明 MIF 具有促进内皮细胞增殖并参与了新生微血管的生成过程。

动脉粥样硬化病灶主要涉及两类血管细胞, 即血管内皮细胞和中膜平滑肌细胞。颈动脉内膜旋切斑块样本与正常人大动脉样本 MIF 染色对照, 发现在人体内分泌 MIF 的主要是单核及内皮细胞, 其分泌 MIF 的量和浓度与斑块的进展密切相关。Chen 等^[14]发现随着冠状动脉粥样硬化病变从 iv 型向 v 型进展, 新生血管的检出率增加至 100%。Jeziorska 等^[15]的研究证明病变各阶段均有新生血管在动脉内膜形成, 并且晚期斑块更明显, 尤其是有着大的脂质核心的不稳定斑块; 这些新生血管与斑块内炎症细胞的分布一致, 而后者与病变的发展, 尤其是晚期斑块破裂明显相关^[16]。Moulton 等^[17]的研究首次分别以血管生成抑制剂 TNP-470 和 Endostatin 作用于动脉粥样硬化动物模型载脂蛋白 E 基因敲除小鼠第一次从治疗的角度直接证实了血管生成是动脉粥样硬化发生发展的关键因素。因此, MIF 诱导血管生成可能是导致斑块不稳定的又一重要方面。我们将利用基因芯片技术在体外研究 MIF 对内皮细胞中血管生成相关基因表达的作用, 探索 MIF 促进血管新生的分子机制; 利用动脉粥样硬化动物模型研究 MIF 对动脉粥样硬化斑块内的血管生成和稳定性的影响。

[参考文献]

- [1] Lin SG, Yu XY, Chen YX, Huang XR, Metz C, Bucala R, et al. De novo expression of macrophage migration inhibitory factor in atherosclerosis in rabbits [J]. *Circ Res*, 2000, **87**: 1202-208
- [2] 徐斌, 尹彤, 赵玉生. 巨噬细胞移动抑制因子在动脉粥样硬化中的作用研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (2): 238-240
- [3] Burger-Kentischer A, Goebel H, Seiler R, Fraedrich G, Schaefer HE, Dimmeler S, et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2002, **105** (13): 1561-566
- [4] Schober A, Bernhagen J, Thiele M, Zeifert U, Knarren S, Roller M, et al. Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of macrophage migration inhibitory factor after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Circulation*, 2004, **109** (3): 380-385
- [5] Nishihira J, Ishibashi T, Fukushima T, Sun B, Sato Y, Todo S. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): Its potential role in tumor growth and tumor-associated angiogenesis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, **995** (2): 171-182
- [6] Amin MA, Volpert OV, Woods JM, Kumar P, Harlow LA, Koch AE. Migration inhibitory factor mediates angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol kinase [J]. *Circ Res*, 2003, **93** (4): 321-329
- [7] Jeziorska M, Woolley DE. Location neovascularization and cellular composition within vulnerable regions of atherosclerotic plaques of human carotid arteries [J]. *J Pathol*, 1999, **188** (2): 189-196
- [8] Traouqi P, Liu JW, Collin O, Clement-Lacroix J, Planus E. Global analysis of endothelial cell line proliferation patterns based on nutrient-depletion models: implications for a standardization of cell proliferation assays [J]. *Cell Prolif*, 2005, **38** (3): 119-135
- [9] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1995, **36** (2): 169-180
- [10] Yang Y, Degranpre P, Kharfi A, Akoum A. Identification of macrophage migration inhibitory factor as a potent endothelial cell growth-promoting agent released by ectopic human endometrial cells [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000, **85** (12): 4721-727
- [11] del Vecchio MT, Tripodi SA, Arcuri F, Pergola L, Hako L, Vatti R, et al. Macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma: correlation with tumor grading and combination endocrine treatment-related changes [J]. *Prostate*, 2000, **45** (1): 51-57
- [12] Takahashi N, Nishihira J, Sato Y, Kondo M, Ogawa H, Ohshima T, et al. Involvement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the mechanism of tumor cell growth [J]. *Mol Med*, 1998, **4** (11): 707-714
- [13] Ogawa H, Nishihira J, Sato Y, Kondo M, Takahashi N, Ohshima T, et al. An antibody for macrophage migration inhibitory factor suppresses tumour growth and inhibits tumour-associated angiogenesis [J]. *Cytokine*, 2000, **12** (4): 309-314
- [14] Chen YX, Nakashima Y, Tanaka K, Shiraiishi S, Nakagawa K, Sueishi K. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in atherosclerosis intimas of human coronary arteries [J]. *Atheroscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19** (1): 131-139
- [15] Jeziorska M, Woolley DE. Neovascularization in early atherosclerotic lesions of human carotid artery: its potential contribution to plaque development [J]. *Hum Pathol*, 1999, **30** (8): 919-925
- [16] Ross JS, Stagliano NE, Donovan MJ, Breitbart RE, Ginsburg GS. Atherosclerosis and Cancer: Common molecular pathways of disease development and progression [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, **947**: 271-292
- [17] Moulton KS, Heller E, Konecny MA, Flynn E, Palinski W, Folkman J. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Circulation*, 1999, **99** (13): 1726-732

(此文编辑 文玉珊)