

· 论 著 ·

伴刀豆球蛋白 A 刺激高胆固醇血症兔的单核细胞释放高水平的生长因子

程万里 邓仲端 Christian Lavagnu^① Patrick Rampal^① 汪道文^② 瞿智玲

(同济医科大学病理学教研室, ②附属同济医院心血管内科, 武汉 430030)

Concanavalin A Stimulates Monocytes from Hypercholesterolemic Rabbits to Release a High Level of Growth Factors

CHEN Wan-Li, DENG Zhong-Duan, Christian Lavagnu^①, Patrick Rampal^①, WANG Dao-Wen^② and QU Zhi-Ling

(Department of Pathology, Tongji Medical University, ② Tongji Hospital, Wuhan 430030, China; ①Laboratoire de Gastroenterologie, U. E. R. de Medicine, AV de Valombrose, 06107 Nice Cedex 2, France)

ABSTRACT

Aim To understand whether peripheral blood monocytes from diet-induced hypercholesterolemic rabbits synthesize and secrete increased growth factors and whether they release a high level of growth factors, when stimulated with concanavalin A (Con A).

Methods The male Japanese lop rabbits were fed on a diet containing 2% cholesterol to develop hypercholesterolemia (HC). The peripheral blood mononuclear leukocytes were isolated using a lymphocyte separation medium. After adhesion and washing to remove the non-adhered cells, the monocytes were harvested and cultured in serum-free DME/F12 medium containing Con A or not. At different intervals the monocyte conditioned media (MC-CMs) under different conditions were collected. The mitogenic assays included: (1) Incorporation of ³H-TdR into DNA in

NIH 3T3 fibroblasts; (2) The effects of MC-CMs on the cell cycle were examined by flow cytometry; (3) Cell counting.

Results The amount of ³H-TdR incorporation into DNA in NIH 3T3 cells induced by Con A-activated hypercholesterolemic rabbit (Con A-Act-HC-MC-CM) was 4.3 and 1.6 times that induced by non-activated hypercholesterolemic rabbit MC-CM (Non-Act-HC-MC-CM) and Con A-activated normal rabbit MC-CM (Con A-Act-N-MC-CM), and the amount of ³H-TdR incorporation induced both by Non-Act-HC-MC-CM and Con A-Act-N-MC-CM was 1.3 and 3.4 times, respectively, than that induced by non-activated normal rabbit MC-CM. Meanwhile the mitogenic activity of all the MC-CMs was significantly stronger than that of the unconditioned medium. Furthermore, the cell number of S+G₂M phases and the total cell number of the 3T3 cells cultured in Con A activated hypercholesterolemic and normal rabbit MC-CMs increased obviously.

Conclusions The peripheral blood monocytes from the rabbits with hypercholesterolemia were in a active state, they could release a high level of growth factors, when stimulated (e.g. by Con A).

KEY WORDS Growth factors; Monocyte; Concanavalin A; Hypercholesterolemia; Rabbit

摘要 复制高胆固醇血症(hypercholesterolemia, HC)兔模型,取其血液分离单核细胞(monocytes, MC),培养于含或不含伴刀豆球蛋白A(concanavalin A, Con A)的无血清DME/F12培养基中,收集不同条件的MC条件培养基(MC-conditioned medium, MC-CM),并检测其促有丝分裂活性。结果表明,经Con A激活的HC兔的MC-CM刺激³H-TdR掺入NIH 3T3

卫生部科学基金资助项目(0655-101号)

①: Laboratoire de Gastroenterologie, U. E. R. de Medicine, A. V. de Valombrose, 06107 Nice Cedex 2, France

细胞 DNA 的量分别为未经激活的 HC 兔和 Con A 激活的正常兔 MC-CM 的 4.3 倍和 1.6 倍, 后者刺激³H-TdR 的掺入量又分别为未经激活的正常兔 MC-CM 的 1.3 倍和 3.4 倍。而且, 所有的 MC-CM 的促有丝分裂活性均明显高于非条件培养基。另外, 将 3T3 细胞培养于 Con A 激活的 HC 兔和正常兔的 MC-CM 时, 其 S+G₂M 期细胞数及总细胞数均明显增加。提示 HC 时, 外周血 MC 处于相当活跃状态, 当其受到某种刺激(如 Con A)时, 可释放高水平的生长因子。

关键词 生长因子; 单核细胞; 伴刀豆球蛋白 A; 高胆固醇血症; 兔

众所周知, 外周血单核细胞(MC)迁入内膜是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生的最早事件。这些细胞被激活后分化为巨噬细胞并摄取大量脂质而变为泡沫细胞。其后, 中膜平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)迁入内皮下间隙增殖, 逐渐成为 As 斑块的主要细胞成分。As 斑块的形成和发展是动脉壁内细胞之间相互调控的结果。细胞之间的相互作用是通过这些细胞合成和分泌生长因子、趋化因子和其它细胞因子而实现的。SMC 迁入内膜及其增殖受多种因素的作用, 尤其是单核/巨噬细胞分泌的细胞因子。由巨噬细胞产生的单核细胞源生长因子(monocyte-derived growth factor, MDGF)^[1]、血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)^[2]和纤维母细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)^[3]等均对 SMC 有促有丝分裂活性和趋化活性的作用。我们也曾报道, 兔腹腔巨噬细胞条件培养基可促进 SMC 的细胞周期进程^[4], 并可引起其迁移^[5]。高胆固醇血症(HC)是 As 的主要危险因素之一。HC 患者的 MC 功能发生改变^[6,7]。已有报道, Con A 可激活人外周血 MC 分泌活性强的生长因子^[8]。本实验以 MC 条件培养基作为生长因子的来源, 观察培养的食饵性 HC 兔的外周血 MC 合成和分泌生长因子是否增多, 以及 Con A 是否能刺激其释放高水平的生长因子, 以阐明 HC 时 MC 参与 As 发生的作用是否增强。

1 材料和方法

1.1 高胆固醇血症模型的复制

用雄性日本大耳白兔 12 只(体重 1.0~1.5 kg, 由同济医科大学动物中心提供), 随机等分为 HC 组和对照组。前者喂以含 2% 胆固醇的饲料, 后者喂以标准兔饲料。实验 6 周, 经检测血脂水平证实 HC 组动物均有 HC(另文报道)。动物经颈动脉插管采血, 肝素抗凝, 用于分离 MC。

1.2 单核细胞的分离、培养及条件培养基的制备

兔外周血 MC 的分离和培养按朱闻宏^[9]方法进行。简言之, 用淋巴细胞分离液(上海试剂二厂)100 ml 加 60% 泛影葡胺(上海信谊药厂)3.5 ml, 用以分离兔血单个核细胞, 再用明胶和自身血浆包被的塑料平皿使 MC 附壁。温育后, 用磷酸缓冲液洗去未附壁的细胞。用 EDTA 收集 MC, 调节细胞浓度为 1×10^6 个/ml。用 Giemsa 和非特异性酯酶染色检查 MC 纯度大于 95%, 台盼蓝拒染试验, 细胞存活率在 90% 以上。

附壁细胞用含 0.2% 牛血清白蛋白、100 ku/L 青霉素、100 mg/L 链霉素及 $10 \mu\text{mol/L}$ α -甲基-D-甘露糖的无血清 DME/F12 混合培养基(Sigma 公司)进行培养。将细胞置于含或不含 ConA 的 DME/F12 培养基, 分别继续培养 24、48 和 72 h 后, 收集其培养基, 即为 Con A 激活的 MC 条件培养基(Con A-activated monocyte-conditioned medium, Con A-Act-MC-CM)和未经激活的 MC 条件培养基(non-activated monocyte conditioned medium, Non-Act-MC-CM)。非条件培养基(unconditioned medium, uCM)用上述 MC 培养基制备, 方法同上, 但其中不含细胞。

1.3 单核细胞条件培养基的活性试验

1.3.1 ³H-胸腺嘧啶核苷掺入试验 用 20~50 代的 NIH 3T3 纤维母细胞进行试验。经胰蛋白酶消化收集细胞, 用含 0.2% BSA 的无血清 DME/F12 培养基重新悬浮细胞, 调细胞密度为 3.5×10^7 个/L, 分种于 24 孔培养板(Falcon), 每孔 1 ml 细胞悬液。经 5% CO₂, 37℃ 静止培养 24 h 后, 吸去原培养液, 每孔加入 1 ml MC-CM 或 uCM, 继续培养 20 h。每孔再加入 ³H-TdR(终浓度为 1 mci/L)脉冲标记 4 h。吸去培养液, PBS 洗涤, 每孔加入 0.1 mol/L NaOH 0.5 ml, 室温下放置 30 min, 使细胞破碎。每孔取 0.3 ml, 加入预先盛有 3.5 ml 闪烁液小瓶内, 液体闪烁计数仪(LKB 公司)检测。

1.3.2 细胞计数及细胞 DNA 含量检测 将 NIH

3T3 细胞置于直径 35 mm 的培养皿(Falcon)中培养, 培养基为含 5% 胎牛血清(fetal calf serum, FCS)的 DMEM。培养 12 h, 换以无血清 DEM/F12 培养基静止培养 24 h。吸去原培养液, 分别加入上述 MC-CM 和 uCM, 继续培养, 每隔 24 h 更换相同的 MC-CM 或 uCM。然后分别于 24、48、72、96 及 120 h 各时间点进行试验。

1.3.2.1 细胞计数 用胰蛋白酶消化, 收集细胞, 经 2% 台盼蓝染色后, 在倒置显微镜下, 用血细胞计数板计数细胞。

1.3.2.2 细胞 DNA 含量 参照 vindelov^[16] 的方法, 用流式细胞仪检测单个细胞的 DNA 含量。简言之, 将收集的细胞离心, $1\,500\times g$, 5 min, 去上清液, 然后用 10 mmol/L Tris-EDTA 缓冲液 1 ml 重新制成悬液。于每 500 μ l 细胞悬液中加入等量缓冲液(10 mmol/L 甘油, pH 10、300 mmol/L NaCl)和 1% Triton X-100、400 μ l RNA 酶(10 g/L)及 50 μ l 溴化乙锭(1 g/L)。4℃, 避光放置 10 min, FACS 3000 型流式细胞仪检测。

1.4 统计学分析

所有数据均数间差异的显著性意义均采用 Student *t* 检验。

2 结果

2.1 正常兔单核细胞条件培养基的促有丝分裂活性

³H-TdR 掺入细胞 DNA 的实验结果表明, 未激活的正常兔 MC 培养 24 h, 释放低水平促有丝分裂活性物质, 其条件培养基(Non-Act-N-MC-CM)刺激³H-TdR 掺入 3T3 细胞 DNA 的量为非条件培养基的 2.1 倍。将 MC 继续培养至 48 或 72 h, 其 CM 的促有丝分裂活性无明显升高。在培养基中加入浓度为 5~20 mg/L 的 Con A, 继续培养 24 h, 其条件培养基(Con A-Act-N-MC-CM)的促有丝分裂活性明显升高, 尤以浓度为 10 mg/L 的 Con A 的刺激效果最佳, 为 Non-Act-N-MC-CM 促有丝分裂活性的 3.4 倍(Figure 1), 但继续培养 48 或 72 h, 其 CM 的活性不再升高。

2.2 高胆固醇血症兔单核细胞条件培养基的促有丝分裂活性

将 HC 兔外周血 MC 培养于不含或含有

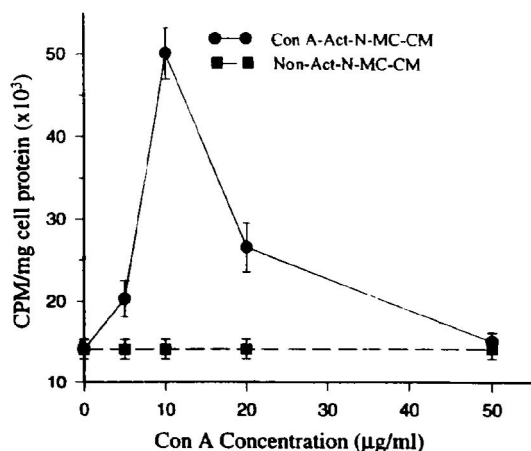


figure 1. The mitogenic activity of the normal rabbit MC-CM. The mitogenic activity of Con A-activated normal rabbit MC-CM, especially stimulated with Con A at a concentration of 10 mg/L, was the most potent.

10 mg/L Con A 的无血清 DME/F12 培养基 24 h, 收集的 CM (Non-Act-HC-MC-CM 及 Con A-Act-HC-MC-CM) 进行以下试验。

2.2.1 ³H-TdR 掺入试验 未经激活的 HC 兔 MC-CM (Non-Act-HC-MC-CM) 的促有丝分裂活性仍然较低, 但比 Non-Act-N-MC-CM 的活性却明显要高。它刺激³H-TdR 掺入 3T3 细胞 DNA 的量分别为非条件培养基和 Non-Act-N-MC-CM 的 2.7 倍($P<0.001$)和 1.3 倍($P<0.01$)。经 Con A 激活的 HC 兔 MC-CM (Con A-Act-HC-MC-CM) 刺激³H-TdR 掺入 3T3 细胞 DNA 的量分别为 Non-Act-N-MC-CM 和 Con A-Act-N-MC-CM 的 4.3 倍($P<0.001$)和 1.6 倍($P<0.001$)(Figure 2)。

2.2.2 单核细胞条件培养基对 3T3 细胞周期的影响 用流式细胞仪检测各样本的单个细胞的 DNA 含量, 并计算出细胞周期各期的细胞数(Table)。培养于非条件培养基的 3T3 细胞多数处于静息状态, 其中 G₀G₁ 期细胞占 78.78%, 而 S+G₂M 期细胞仅占 21.22%, 而培养于 Con A 激活的 MC-CM 的 3T3 细胞均处于活跃增殖状态, 其中培养于 Con A-Act-HC-MC-CM 的 3T3 细胞比培养于 Con A-Act-

N-MC-CM 的更为活跃。前者的 S+G₂M 期的细胞占 37.21%, 而后者占 31.78%。这两种 MC-CM 的促有丝分裂活性分别相当于 5% FCS 的 70.3% 和 46.4%。

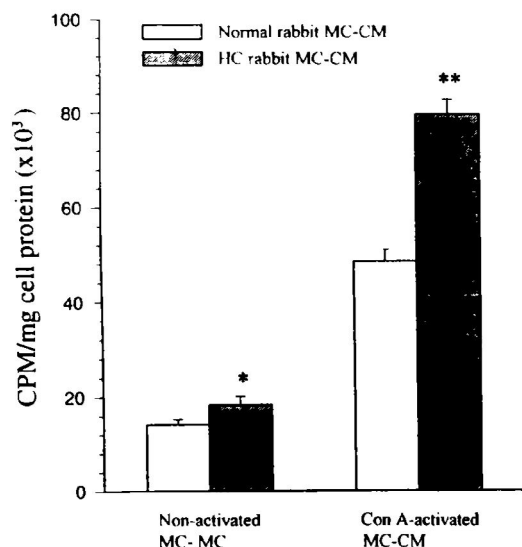


Figure 2. The H-TdR incorporation into DNA in 3T3 cells induced by non-activated and Con A-activated normal and HC rabbit MC-CMs. * Compared with Non-Act-N-MC-CM, $P < 0.01$. ** Compared with Con A-Act-N-MC-CM, $P < 0.001$.

2.2.3 单核细胞条件培养基对 3T3 细胞生长的影响 细胞计数结果, 静止培养的 3T3 细胞在非条件培养基中培养 24 或 48 h, 其细胞数量仅略有增加, 而培养于 Con A 激活的 MC-CM 中的 3T3 细胞数则随着时间的延长而呈直线上升。其中, 培养于 Con A-Act-HC-MC-CM 的 3T3 细胞的数量, 在培养 24 及 48 h, 分别为培养于非条件培养基的 2.6 倍 ($P < 0.001$) 和 3.8 倍 ($P < 0.001$)。培养于 Con A-Act-N-MC-CM 中的 3T3 细胞数, 在培养 24 及 48 h, 则分别为非条件培养基的 2.1 倍 ($P < 0.001$) 和 2.4 倍 ($P < 0.001$)。再者, 培养于 Con A-Act-N-MC-CM 中的 3T3 细胞数, 在培养 24 及 48 h, 分别为培养于 Con A-Act-N-MC-CM 中的 1.3 倍 ($P < 0.05$) 和 1.8 倍 ($P < 0.001$)。从细胞计

数推断, Con A-Act-HC-MC-CM 和 Con A-Act-N-MC-CM 的促有丝分裂活性分别相当于 5% FCS 的 71.2% 和 50.6% (Figure 3), 这与流式细胞仪检测的结果一致。

Table. The effect of Con A-activated HC and normal rabbit MC-CM on the cell cycle of 3T3 cells.

Group	Cell distribution in different phases (%)		
	G ₀ +G ₁	S	G ₂ +M
1	78.78	13.25	7.97
2	68.23	24.29	7.49
3	62.79	26.16	11.05
4	56.04	31.05	12.92

1, Control (unconditioned medium); 2, Con A-Act-N-MC-CM; 3, Con A-Act-HC-MC-CM; 4, 5% FCS.

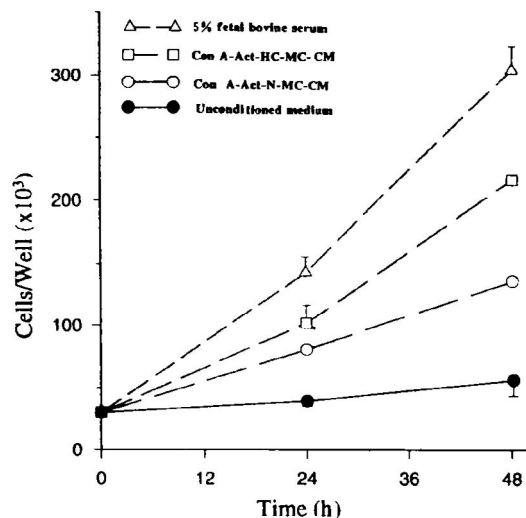


Figure 3. The effect of Con A-activated HC and normal rabbit MC-CMs on the growth of 3T3 cells. The cell number, cultured in both MC-CM, increased significantly.

3 讨论

众所周知, 高胆固醇血症是 As 的主要危险因素之一。高胆固醇血症 (HC) 如何引起 As, 机制极为复杂, 但主要是进入内膜的脂蛋白被修饰, 产生氧化修饰的低密度及极低密度脂蛋白。巨噬细胞摄取这些脂蛋白后变为泡沫细胞。由于氧化型脂蛋白的细胞毒性, 可导致泡沫细胞坏死, 并刺激动脉壁细胞分泌细胞因子而相互作用, 促进 As 病变的形成和发展^[1]。据

Jongkin^[6]及 Bath^[7]等报道,高胆固醇血症患者的 MC 功能发生改变,表现为对兴奋剂甲酰-甲硫氨酰-亮氨酸-苯丙氨酸(N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine)敏感,使之粘附于内皮细胞、迁移和穿过内膜增强,以及其表面的粘附蛋白(CD116/CD18)表达增加。据 Rogers 等^[12]报道,大鼠食饵性高胆固醇血症时,腹腔巨噬细胞的功能增强,包括粘附于 EC 及 SMC、诱导 SMC 产生趋化因子、促有丝分裂原和释放超氧化物等,这些均可促使 As 病变的形成。本实验结果表明,Non-Act-N-MC-CM 刺激³H-TdR 掺入 3T3 细胞 DNA 的量为非条件培养基掺入量的 2.1 倍,而 Non-Act-HC-MC-CM 的³H-TdR 掺入量比 Non-Act-N-MC-CM 明显要高,其刺激³H-TdR 掺入 3T3 细胞 DNA 的量分别为非条件培养基和 Non-Act-N-MC-CM 的 2.7 倍和 1.3 倍。可见培养的 HC 兔的 MC 比正常兔的 MC 产生更多的促有丝分裂活性。

据 Glenn 和 Ross 报道^[8],内毒素和 ConA 可激活培养的人单核细胞分泌对人 SMC、纤维母细胞和 3T3 细胞有强活性的生长因子。本实验结果表明,Con A-Act-HC-MC-CM 刺激³H-TdR 掺入 3T3 细胞 DNA 的量分别为 Non-Act-HC-MC-CM 和 Con A-Act-N-MC-CM 的 4.3 倍和 1.6 倍。同时,从各种 MC-CM 对 3T3 细胞细胞周期的影响来看,Con A 激活的 MC-CM 均可使培养的 3T3 细胞处于活跃增殖状态,且 Con A-Act-HC-MC-CM 强于 Con A-Act-N-MC-CM。另外,从细胞计数结果看,上述两种经 ConA 激活的 MC-CM 均明显刺激 3T3 细胞增殖,而且,前者强于后者。

综上所述,可以认为,高胆固醇血症(HC)时外周血单核细胞(MC)及内膜巨噬细胞均处于相当活跃状态。当其受到某种刺激(如伴刀豆球蛋白(Con) A)时,可合成和分泌某些生长因子和(或)趋化因子,引起中膜平滑肌细胞(SMC)迁移和增殖,在动脉粥样硬化(As)斑块的形成和发展中起重要作用。

参考文献

- 1 Singh JP, Bonin PD. Purification and biochemical properties of a human monocyte-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**(17): 6374~378.
- 2 Shimokado K. A significant part of macrophage-derived growth factors consist of at least two forms of PDGF. *Cell*, 1985, **43**(1): 277~286.
- 3 Klagsbrum M, Edelman ER. Biological and biochemical properties of fibroblast growth factors, implication for the pathogenesis of atherosclerosis. *Arteriosclerosis*, 1989, **9**(3): 269~278.
- 4 邱红明, 邓仲端, 武忠弼, 等. 巨噬细胞源性生长因子对培养的动脉平滑肌细胞细胞周期进程的影响. *中华病理学杂志*, 1990, **19**(1): 4~7.
- 5 邓仲端, 邱红明, 瞿智玲, 等. 巨噬细胞源性趋化因子所致的平滑肌细胞迁移. *中华病理学杂志*, 1993, **22**(3): 163~165.
- 6 Jongkind JF, Verkerk A, Hoogerbrugge N. Monocytes from patients with combined hypercholesterolemia-hypertriglyceridemia and isolated hypercholesterolemia show an increased adhesion to endothelial cells in vitro; II influence of intrinsic and extrinsic factors on monocyte binding. *Metabolism*, 1995, **44**(3): 374~378.
- 7 Bath PM, Gladwin AM, Martin JF. Human monocyte characteristics are altered in hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis*, 1991, **90**(2,3): 175~181.
- 8 Glenn KC, Ross R. Human monocyte-derived growth factor(s) for mesenchymal cells; activation of secretion by endotoxin and concanavalin A. *Cell*, 1981, **25**(3): 603~615.
- 9 朱国宏, 邓仲端. 兔血单核细胞的分离方法. *中国病理生理杂志*, 1992, **8**(4): 405.
- 10 Vindelov L. Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA cells from solid tumors and cell suspensions; a new method for rapid isolation and staining of nuclei. *Virchow's Arch B Cell Pathol*, 1977, **24**(3): 227~242.
- 11 Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA. A modern view of atherogenesis. *Am J Cardiol*, 1993, **71**(6): 9B~14B.
- 12 Rogers KA, Hoover RL, Castellot Jr JJ, et al. Dietary cholesterol-induced changes in macrophage characteristics: relationship to atherosclerosis. *Am J Pathol*, 1986, **125**(2): 284~291.

(1996-08-12 收到)