

L-精氨酸抑制内皮细胞粘附分子-1 表达与氧化型低密度脂蛋白促单核细胞粘附作用下降有关

林曙光 陈颜芳 伍淑英^① 杨和平^①

(广东省心血管病研究所, 广州 510100)

Effect of L-Arginine on Oxidized Low Density Lipoprotein Induced Monocyte Adhesion is associated with a Reduction of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Endothelial Cells

LIN Xu-Guang, CHEN Yan-Fang, WU Shu-Ying^① and YANG He-Ping^①

(Guangdong Cardiovascular Institute, Guangzhou 510100;

^①Molecular Biology Center, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT

Aim The purpose of this study was to investigate the effect of L-arginine on oxidized low density lipoprotein (OLDL) induced monocytes adhesion and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in cultured porcine aortic endothelial cells.

Methods The porcine aortic endothelial cells (EC) were isolated using an enzyme dispersal method, and cultured in M199 cell culture media containing 20% fetal bovine serum. Monocytes (MC) were isolated from normal human blood by Ficoll-Hopaque density grade centrifugation. Human oxidized LDL was obtained from normal human plasma by ultracentrifugation, and oxidized by Cu^{2+} . The effect of L-arginine on OLDL mediated EC-MC adhesion was determined by analysing protein contents of cells. Vascular cell adhesion molecule-1 mRNA expression in EC was determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results Treatment of EC with OLDL led to an increase in VCAM-1 mRNA expression and adhesion rate of monocyte in dose-(0.05, 0.1 and 0.2 $\mu\text{g/L}$) and time-(2, 4 and 6 h) dependent manners. L-arginine inhibited the expression of VCAM-1 in EC and adhesion of MC induced by OLDL also in a dose-(1, 2 and 4 mmol/L) and time (2, 4 and 6 h) dependent manners.

Conclusion The effect of L-arginine on OLDL induced monocyte adhesion is associated with a reduction of VCAM-1 expression in endothelial cells.

KEY WORDS L-arginine; Oxidized low density lipoprotein; Endothelial cells; Monocytes; Vascular cell adhesion molecule-1

摘要 用氧化型低密度脂蛋白处理培养的猪主动脉内皮细胞,以 Ficoll-Hopaque 分离液密度梯度离心分离人外周血单核细胞,观察 L-精氨酸对内皮细胞—单核细胞粘附率的影响;采用反转录—多聚酶链反应技术检测氧化型低密度脂蛋白和 L-精氨酸对内皮细胞血管细胞粘附分子-1 表达的影响。结果显示: L-精氨酸具有剂量和时间依赖性抑制氧化型低密度脂蛋白的促内皮细胞—单核细胞粘附作用。氧化型低密度脂蛋白处理内皮细胞能明显增加内皮血管细胞粘附分子-1 的表达,而 L-精氨酸抑制氧化型低密度脂蛋白的此种作用。结果提示 L-精氨酸可能通过抑制血管细胞粘附分子-1 表达抑制氧化型低密度脂蛋白的促内皮细胞—单核细胞粘附作用。

关键词 L-精氨酸; 氧化型低密度脂蛋白; 单核细胞; 内皮细胞; 血管细胞粘附分子-1

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 早期病变形成的重要环节之一是血液中单核细胞 (monocyte, MC) 与内皮细胞 (endothelial cell,

^① 衡阳医学院分子生物学研究中心, 衡阳 421001

EC)粘附,继而迁移到内皮下,转变为巨噬细胞(macrophage, MP)。正常情况下,MC难以与EC粘附,当血液中的某些因素如氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, OLDL)等与EC相互作用后,使EC粘附性增加^[1]。血管细胞粘附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)表达在As早期形成过程中有重要意义,它能特异地介导MC与EC粘附^[2,3]。而L-精氨酸作为一氧化氮(nitric oxide, NO)的前体,已广泛应用于人类疾病的探索性治疗,已显示了良好的改善内皮功能及抗As的作用,但尚不完全清楚L-精氨酸抗As的机理。本研究观察了L-精氨酸对EC-MC粘附及VCAM-1表达的影响,探讨L-精氨酸抗As的作用机理,为防治As提供新思路。

1 材料与方法

1.1 猪胸主动脉内皮细胞培养

无菌条件下取猪胸主动脉10 cm左右,剥去血管外膜,以D-Hank's液洗净,纵行剪开血管,内膜朝下,置盛有5 ml 0.1%胶原酶(Ⅱ型)溶液的容器中,37℃孵育15~20 min,再以含20%胎牛血清的M199培养液终止反应,用小匙轻刮内膜,使EC脱落,收集消化液,以1 000 r/min离心10 min,沉淀物加含20%胎牛血清的M199培养液制成悬液,细胞计数,以 2×10^4 个/cm²种植于培养瓶中,置二氧化碳培养箱培养,待内皮细胞汇合成单层后用0.25%胰蛋白酶消化传代。第5代细胞汇合后用于实验。

1.2 氧化型低密度脂蛋白的制备与鉴定

取健康人新鲜空腹血浆,采用顺序超离心法,先以30 000 r/min离心18 h除去极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL),再以40 000 r/min离心24 h分离低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)($1.019 < d < 1.063$)。将LDL(1 μg/L)置含10 μmol/L Cu²⁺的磷酸缓冲液(PBS)中,37℃温育7 h。氧化后的LDL在含乙二胺四乙酸(EDTA)的PBS中透析24 h(4℃)。测硫代巴比妥酸反应物(thiobarbituric acid reactive substance, TBARS)值以判定脂蛋白是否被氧化。用Cu²⁺氧化后脂蛋白的TBARS值明显高于非氧化脂蛋白,前者为67.3~79.4 mmol/L·g(protein),后者为1.5~4.1 mmol/L·g(protein)。

1.3 单核细胞悬液制备

取肝素抗凝人全血,加等量PBS液(pH 7.4 含1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L 枸橼酸钠)稀释。以Ficoll-Hopaque分离液一次性密度梯度离心(2 000 r/min, 30 min),吸取中层单核细胞并置于用胎牛血清处理过的培养皿内,37℃温育1 h让单核细胞附壁,再以PBS清洗去掉非粘附细胞,然后用0.9% EDTA的PBS液(含5%胎牛血清)悬浮出单核细胞,细胞计数后2 000 r/min离心30 min,用1%胎牛血清M199培养液悬浮细胞,调细胞浓度至 $(0.5 \sim 1.2) \times 10^6$ 个/L,用0.4%台盼兰检查单核细胞成活率大于90%。

1.4 内皮细胞-单核细胞粘附率测定

用含10%胎牛血清M199培养液将猪第5代主动脉EC在9孔培养板上生长融合,继用含5%胎牛血清的DMEM培养液2 ml(对照)和含不同浓度的正常LDL(n-LDL)和OLDL的上述培养液(实验)与之在37℃温育24 h,然后吸出培养液,洗二次,再加含 1×10^5 个/L MC的M199培养液2 ml,37℃温育1 h,每15 min摇动一次。洗去未粘附细胞,以NaOH溶解细胞,测溶解液蛋白含量。以不加MC的培养孔内EC蛋白含量为基础,计算MC粘附率。

$$\text{粘附率} = \frac{\text{EC+MC粘附后的细胞蛋白量} - \text{EC蛋白量}}{\text{加入MC蛋白量}} \times 100\%$$

实验过程中,以0.1 μg/L OLDL作用于内皮细胞2.4和6 h,观察其对EC-MC粘附的时间效应;在观察OLDL对EC-MC粘附影响的剂量效应时设计剂量分别为0.05、0.1和0.2 μg/L。在观察L-精氨酸的时间效应时,以0.1 μg/L OLDL加上2 mmol/L L-精氨酸分别温育2.4和6 h;在观察L-精氨酸的剂量效应时,用0.1 μg/L OLDL分别加上1、2和4 mmol/L L-精氨酸。

1.5 RNA制备

总RNA提取按Chomczynski和Sacchi方法^[4],取 1×10^5 细胞置于100 μl溶液D(4 mol/L 异硫氰酸胍, 25 mol/L 醋酸钠, pH 7.0, 0.5% N-十二烷基肌酸钠, 0.1 mol/L β-巯基乙醇)中,倒转混合;加10 μl醋酸钠(2 mol/L pH 4.0),加100 μl水饱和酚(pH 4.0)和20 μl氯仿/异戊醇(25:1);剧烈振荡10 s;在16 000 r/min离心20 min(4℃),将水相转移至新的离心管,加100 μl异丙醇,于4 000 r/min离心10 min。沉淀用4 mol/L 氯化锂抽提后,再用氯仿/异戊醇抽提。RNA用70%乙醇和0.3 mol/L醋酸钠沉淀。将RNA溶解在20 μl水中。取2 μl RNA加8 μl水,用紫外分光光度仪测RNA浓度。260/280 nm光密度比值在1.8~2.0之间。

1.6 反转录

1 μg 总 RNA 用于反转录成 cDNA^[5]。将 RNA 于 65℃ 下变性 3 min, 依次加入 0.5 mmol/L dNTP, 0.01 mmol/L 二硫苏糖醇, 10 pmol/L 随机引物, 1 u MM-LV Super Script 反转录酶, 1 u RNasin, 50 mmol/L Tris · HCl (pH 8.3), 75 mmol/L KCl 和 3 mmol/L MgCl₂。总体积为 20 μl 。在 42℃ 温育 90 min, 加入 50 μl 终止液 (10 mmol/L Tris · HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA) 于 70℃ 温育 10 min。

1.7 定量多聚酶链反应

以三磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 基因表达为内对照, 检测 VCAM-1 基因表达。所使用引物序列见 Table 1。取 100 ng cDNA, 加入下列试剂混合物 (0.8 $\mu\text{mol/L}$ 引物, 1.25 u Taq DNA 多聚酶, 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 10 mmol/L Tris · HCl pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, α -³²P-dCTP 0.5 μCi), 使终体积为 50 μl 。PCR 反应条件: 变性 94℃ 1 min, 退火 55℃ 1 min, 延伸 72℃ 1.5 min, 25 个循环。反应产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳 (1×TAE), 在紫外光下切下 PCR 特异性条带, 用 β 计数器测量放射性活度。

Table 1. 5'-and 3'-primers of target genes used in PCR experiments.

Gene	primer	reference	product (bp)
VCAM-1	5'-AGTGGTGGCTCGTGAATGG-3'	Osborn L	700
	5'-CTGTGCTCTCCTGCTCCGCT-3'		
GAPDH	5'-GCTTTAACTCTGGTAAAGTGG-3'	Nasauer A	528
	5'-TCACGCCACAGTTTCCCGAGG-3'		

1.8 统计学分析

所有数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较为方差分析 t 检验。

2 结果

2.1 氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞—单核细胞粘附率的影响

氧化型低密度脂蛋白 (0.1 $\mu\text{g/L}$) 与内皮细胞作用 2 h 后, EC-MC 粘附率明显增加 (14.04 ± 3.61 比 11.44 ± 2.68, $P < 0.05$), 4 h 达高峰 (39.65 ± 6.23 比 12.48 ± 3.18, $P < 0.001$), 6 h 有所下降, 但仍比对照组高 (24.15 ± 5.46 比 13.37 ± 5.63, $P < 0.01$)。该结果提示正常对照组 EC-MC 粘附不呈时间依赖性,

OLDL 促进 EC-MC 粘附, 并呈时间依赖性。

当 OLDL 分别以 0.05、0.1 和 0.2 $\mu\text{g/L}$ 与内皮细胞温育 4 h 后, 其 EC-MC 粘附率分别为 14.61 ± 2.36 比 11.63 ± 1.23 ($P < 0.05$)、36.79 ± 8.40 比 11.73 ± 1.62 ($P < 0.01$) 和 42.75 ± 11.22 比 11.84 ± 1.88 ($P < 0.01$), 表现出明显的剂量依赖性。

2.2 L-精氨酸对氧化型低密度脂蛋白促内皮细胞—单核细胞粘附的影响

氧化型低密度脂蛋白 (0.1 $\mu\text{g/L}$) 与内皮细胞温育 4 h 明显地促进 EC-MC 粘附, L-精氨酸 (1、2 和 4 mmol/L) 三个浓度均对抗 OLDL 的促粘附作用, 并呈剂量依赖性 (Table 2)。以 0.1 $\mu\text{g/L}$ OLDL 加上 2 mmol/L L-精氨酸分别温育 2、4 和 6 h 能对抗 OLDL 的作用, 并呈时间依赖性 (Table 3)。

Table 2. Effect of L-arginine on OLDL mediated EC-MC adhesion in a dosedependent manner ($\bar{x} \pm s$).

Groups	n	adhesive rate (%)
control	9	11.73 ± 1.62
OLDL	8	36.79 ± 8.40 ^a
L-Arg1+OLDL	8	28.37 ± 6.21 ^b
L-Arg2+OLDL	8	21.53 ± 5.44 ^c
L-Arg4+OLDL	8	18.43 ± 4.77 ^c

L-Arg, L-Arg2 and L-Arg4 express 1, 2 and 4 mmol/L L-Arginine. a: $P < 0.01$, compared with control group; b: $P < 0.01$, compared with OLDL group; c: $P < 0.01$, compared with L-Arg1+OLDL group.

Table 3. Effect of L-arginine on OLDL mediated EC-MC adhesion in a timedependent manner ($\bar{x} \pm s$).

Groups	n	adhesive rate (%)
control	9	11.73 ± 1.62
OLDL	8	36.79 ± 8.40 ^a
L-Arg+OLDL (2 h)	8	31.46 ± 5.67 ^b
L-Arg+OLDL (4 h)	8	21.53 ± 5.44 ^c
L-Arg+OLDL (6 h)	8	19.63 ± 5.78 ^c

a: $P < 0.01$, compared with control group; b: $P < 0.05$, compared with OLDL group; c: $P < 0.01$, compared with L-Arg+OLDL (2 h) group.

2.3 血管细胞粘附分子-1 mRNA 表达

正常内皮细胞(未加处理因素)VCAM-1 的 mRNA 转录水平低,用 OLDL 处理 2 h 能明显增加内皮细胞 VCAM-1 的表达,而 L-精氨酸能对抗 OLDL 所诱导的内皮细胞 VCAM-1 的表达,并呈剂量依赖关系(Table 4)。

Table 4. Effect of L-arginine on OLDL induced VCAM-1 mRNA expression ($\bar{x} \pm s$, cpm counts).

Groups	n	VCAM-1	GAPDH
control	7	540 \pm 58	1 784 \pm 163
OLDL	6	1 963 \pm 278 ^a	1 853 \pm 237
L-Arg1+OLDL	6	1 537 \pm 221 ^b	1 778 \pm 256
L-Arg2+OLDL	6	1 256 \pm 184 ^c	1 694 \pm 264
L-Arg4+OLDL	6	1 037 \pm 175 ^c	1 841 \pm 283

a: $P < 0.01$, compared with control group; b: $P < 0.01$, compared with OLDL group; c: $P < 0.01$, compared with L-Arg1+OLDL.

3 讨论

高胆固醇血症动物最早出现的血管壁异常为单核细胞与 EC 粘附性增高^[6],OLDL 可改变内皮屏障的成分和通透性^[7],并引起内皮细胞、巨噬细胞、血小板和白细胞活化,可能为其致 As 的重要原因^[1,8]。已有的实验表明,OLDL 引起白细胞与内皮细胞粘附有如下几个因素:反应氧代谢产物^[9,10]、白三烯^[11]、血小板活化因子、白细胞粘附糖蛋白 CD11/CD12^[11]。本实验观察到 OLDL 呈剂量依赖性促进 EC-MC 粘附,同时 OLDL 能诱导内皮细胞 VCAM-1 表达,提示 OLDL 促进单核细胞粘附于内皮可能与 VCAM-1 的表达有关。

高胆固醇血症时 OLDL 及超氧化物引起 NO 产生减少,而 NO 的前体物 L-精氨酸可逆转相应的白细胞粘附反应。Lefer 等^[12]观察到新西兰兔进食高胆固醇饮食二周内皮细胞 NO 基础释放显著减少,一周后中性粒细胞对冠状动脉内皮的粘附性显著增加。Provost 等^[13]研究了在体猪动脉内皮源性 NO 对血小

板、中性粒细胞粘附性的影响,结果显示 NO 可抑制血小板、中性粒细胞与内皮的相互作用(interaction);而预先应用 L-精氨酸促进 NO 产生,可直接干扰中性粒细胞的功能而起保护作用。Drexler 等^[14]在实验中将高胆固醇血症兔的胸主动脉置于培养皿中,使内皮细胞与培养的单核细胞接触,结果发现高胆固醇血症时单核细胞与主动脉 EC 的粘附性增加,而用 L-精氨酸处理可降低这一反应。应用一氧化氮合成酶抑制剂可促进单核细胞粘附,说明内皮源性 NO 在调节 EC 与 MC 的粘附中起重要作用。Liao 等^[15]证实 Cu²⁺ 修饰的 LDL(OLDL)作用于大鼠肠系膜微循环,引起明显的白细胞粘附现象,而外源性 NO 供体如硝普钠、精氨酸或以 L-精氨酸处理能明显降低 OLDL 诱导的反应。本实验在观察到 L-精氨酸抗 OLDL 诱导 EC-MC 粘附作用的同时,发现其抑制作用与 VCAM-1 表达有关。L-精氨酸抑制 OLDL 诱导粘附分子 VCAM-1 表达为其抗 As 药用前景提供了又一新的理论依据。

参考文献

- Berliner JA, Terino MC, Seranian A, et al. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interaction. *J Clin Invest*, 1990, **95**: 1 260 ~263.
- Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherosclerosis. *Science*, 1991, **251**: 788~791.
- Osborn L, Hession C, Tizard R, et al. Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule-1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell*, 1989, **59**: 1 203~211.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**: 156~159.
- Ungerer M, Bohm M, Elce J, et al. Altered expression of β -adrenergic receptor kinase(β ARK) and β 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation*, 1993, **87**: 454~463.
- Nanauer A, Mendel JL. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family: Structure of a human cDNA and of an X chromosome linked pseudogene;amaz-

- ing complexity of the gene family in mouse. *EMBO J*, 1984, **3**: 2 627~633.
- 7 Guretzki HJ, Gerbitz KD, Olgemoller B, et al. Atherogenic level of low density lipoprotein alter the permeability and composition of the endothelial barrier. *Atherosclerosis*, 1994, **107**: 15~18.
 - 8 Quinn MT, Parthasarathy S, Fong LG, et al. Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophage during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**: 2 995~997.
 - 9 Lehr HA, Becker AM, Markland SL, et al. Superoxide-dependent stimulation of leukocyte adhesion by oxidatively modified LDL in vivo. *Arterioscler Thromb*, 1992, **12**: 826~829.
 - 10 Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 1988, **333**: 664~666.
 - 11 Lehr HA, Mrber M, Hubner C, et al. Stimulation of leukocyte/endothelium interaction by oxidized low-density lipoprotein in hairless mice. *Lab Invest*, 1993, **68**: 388~392.
 - 12 Lefer AM, Ma XL. Decreased basal nitric oxide release in hypercholesterolemia increases neutrophil adherence to rabbit coronary artery endothelium. *Arterioscler Thromb*, 1993, **13**(6): 771~773.
 - 13 Provost P, Jules YTL, Lucie L, et al. Endothelium derived nitric oxide attenuates neutrophil adhesion to endothelium under flow condition. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14**(3): 331~333.
 - 14 Drexler H, Fishell TA, Pinto FJ, et al. Effect of L-arginine on coronary endothelial function in cardiac transplant recipients. *Circulation*, 1994, **89**(4): 1 615~618.
 - 15 Liao LX, Granger DN. Modulation of oxidized low density lipoprotein induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Am Physiol Soci*, 1995, **268**: H1 643~H647.

(1996-07-07 收到, 1996-08-24 修回)

· 书 讯 ·

《急诊学》出版发行

由北京、上海、南京、同济医科大学及泰山医学院等 40 余所高等医学院校和医疗科研单位近百位知名专家、教授执笔撰写的《急诊学》一书,于 1997 年 1 月由中国医药科技出版社出版发行。著名急诊医学专家、北京协和医院邵孝铨教授主审,中华医学会急诊医学学会主任委员王一镗教授作序。全书共 16 章,分别介绍了急诊医学的发展历史、现场急救与护送、重症监护病房的实施、心肺脑复苏、危重病监测、各种危急重症、灾难医学、急诊影像学、抗生素和糖皮质激素在急诊病人中的应用及常用急救技术等,书末收录了急诊常用药物和检验正常值等。该书理论联系实际,具有很高的学识水平,又极富实用价值。适用于从事急诊工作的内、外、妇、儿和眼耳鼻喉等各科医护人员学习与参考,可作为医学院校教材,同时也适合于基层医务人员学习与查阅之用。全书 100 余万字,16 开本,定价 29.80 元。欲订购者,请按下列地址汇款订购,款到发书。

汇款地址: 山东省泰安市泰山医学院附属医院 史继学收。

邮编: 271000

电话: (0538)8415581 或 8417152 转 2325、2230