脂质过氧化诱导培养的内皮细胞表达单核细胞趋化蛋白-1

夏春枝　　邓仲端
(同济医科大学病理学教研室，武汉 430030)

Lipid Peroxidation Induces Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Cultured Endothelial Cells

XIA Chun-Zhi and DENG Zhong-Duan
(*Department of Pathology, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China*)

ABSTRACT

Aim To observe whether lipid peroxidation injury to cultured human umbilical vein endothelial cells and bovine aortic endothelial cells has effects on the expression of monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) in them.

Methods The lipid peroxidation injury to endothelial cells (EC) was induced by exposure to diamide either at a same concentration but for different incubation time or at different concentrations but for a same incubation time. The EC in different groups were collected and their total RNA was extracted by the single-step method. The MCP-1 mRNA expression in EC was examined by dot blotting using a γ^{32}P-end labeled 35 mer-oligonucleotide probe, Meanwhile, MCP-1 protein content in the media conditioned by the cultured EC exposed to diamide was determined by sandwich ELISA.

Results Cultured EC could express MCP-1 mRNA and protein. Dot blotting showed that exposure of EC to diamide at a concentration of 5 μmol/L for 2, 4 and 8 h, respectively, resulted in a 2.26 fold, a 2.41 fold and a 2.72 fold increase in the levels of MCP-1 mRNA expression in EC respectively, as compared to the control group. On the other hand, exposure of EC to diamide at different concentrations(1 μmol/L, 5 μmol/L and 10 μmol/L) for 3 h, resulted in a 2.22 fold, 2.97 fold and 3.32 fold increase in the levels of MCP-1 mRNA expression in EC respectively. The results of ELISA were similar to that of dot blotting.

Exposure of EC to diamide at a same concentration but for different incubation time resulted in a 2.18 fold, a 3.87 fold and a 5.87 fold increase in MCP-1 protein content in the conditioned media. By contrast, exposure of EC to diamide at different concentration but for a same incubation time resulted in a 2.34 fold, a 3.44 fold and a 4.6 fold increase in MCP-1 protein content in the conditioned media. Together these results showed that the MCP-1 expression in EC induced by exposure to diamide was dependent on both dose and the incubation time.

Conclusion Lipid peroxidation to EC can induce increased production of MCP-1 in the cells and may play an important role in the recruitment of monocytes into the intima in atherogenesis.

KEY WORDS Lipid peroxidation injury; Endothelium; Monocyte chemoattractant protein-1; Diamide; Atherosclerosis

摘要 在人脐静脉和牛主动脉内皮细胞培养基中加入联胺，引发其脂质过氧化损伤，观察能否诱导内皮细胞表达单核细胞趋化蛋白-1。用斑点杂交法检测内皮细胞暴露于联胺后其单核细胞趋化蛋白-1 mRNA 的表达，杂交用的探针为 γ^{32}P5' 末端标记的寡核苷酸探针。同时，用酶联免疫反应检测内皮细胞暴露于联胺后，其条件培养基中的单核细胞趋化蛋白-1 蛋白含量。斑点杂交显示，培养的内皮细胞可表达单核细胞趋化蛋白-1 mRNA，暴露于联胺后，其单核细胞趋化蛋白-1 mRNA 表达水平明显升高。而且，单核细胞趋化蛋白-1 mRNA

国家自然科学基金资助项目

表达水平与联胺的作用时间和浓度均呈正相关。酶联免疫反应显示，各组条件培养基中的单核细胞趋化蛋白-1蛋白含量亦与联胺作用的时间和浓度呈正相关。提示内皮细胞的脂质过氧化损伤可诱导其产生单核细胞趋化蛋白-1增加，在动脉粥样硬化发生过程中单核细胞的聚集可能起重要作用。

关键词　脂质过氧化；　内皮细胞；　单核细胞趋化蛋白-1；　联胺；　动脉粥样硬化

已知单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1)对单核细胞迁入内皮下间隙起着重要的作用，并对动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发生极为重要[1]。近年来的研究表明，内皮细胞脂质过氧化与As关系密切[2]。然而，内皮细胞脂质过氧化损伤通过什么环节促进As的发生尚未完全清楚。因此，本研究将联胺作用于培养的内皮细胞，引发内皮细胞脂质过氧化损伤，观察其是否表达高水平的单核细胞趋化蛋白-1，来探讨脂质过氧化诱发As的发病机制。

1　材料和方法

1.1　人脐静脉内皮细胞培养及RNA提取

将传代培养的人脐静脉内皮细胞株(内皮细胞V304，武汉大学中国典型物贮存中心)培养于含10%小牛血清的M199培养基。待细胞融合后，将细胞随机分成对照组和实验组。对照组不加联胺，实验组加5 μmol/L的联胺培养液，分别于2 h、4 h及8 h弃去培养液，经缓冲液洗涤后，加无血清DME/F12混合培养基，继续培养24 h，收集条件培养液(conditioned media, CM)，再经胰蛋白酶消化后收集细胞，异硫氰酸胍法[3]提取其总RNA，—70℃保存备用。

1.2　牛主动脉内皮细胞培养及RNA提取

取小牛胸主动脉，经缓冲液洗净后，夹住各动脉分支，灌满0.25%胰蛋白酶(GIBCO)，于37℃消化15 min后，用缓冲液洗涤，收集消化液，1 000 r/min离心10 min，弃去上清，用含10%胎牛血清的M199培养液悬浮细胞，在37℃、5%CO_2条件下培养，隔天换液一次。待细胞融合后，以0.1%的胰蛋白酶消化传代。倒置显微镜下，细胞呈多角形，密集呈单层铺路石状；用Ⅷ因子相关抗原免疫荧光法鉴定细胞，在荧光显微镜下，胞浆内显示明亮的荧光。将融合后的内皮细胞随机分为对照组和实验组。弃去原培养液，实验组分别加含1 μmol/L、5 μmol/L和10 μmol/L联胺的培养液；对照组不加联胺，每组10瓶细胞。3 h后弃去培养液，缓冲液洗涤，加无血清DME/F12混合培养液并收集细胞，异硫氰酸胍法提取细胞的总RNA，—70℃保存备用。

1.3　斑点杂交

将提取的RNA每个样本20 μg点样于硝酸纤维素膜上，57℃预杂交3 h以后，加γ^{32}P标记的寡核苷酸探针(杂交探针为35对碱基组成的寡核苷酸，它与MCP-1 cDNA的第257～291个核苷酸互补)57℃杂交过夜。杂交膜用洗膜液洗涤后，—70℃放射自显影72 h。常规显影定影后，用图像分析仪测定每个斑点的积分光密度，据此判定MCP-1 mRNA的表达水平。

1.4　条件培养液中的单核细胞趋化蛋白-1蛋白含量检测

参照Evanoff等[4]方法，用夹心酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)进行。简述如下：用MCP-1多克隆抗体(1∶100，中国军事医学科学院提供)包被96孔酶标板，每孔200 μL。4℃过夜，每孔用清洗缓冲液清洗三次，分别加MCP-1标准品(GIBCO，稀释在含2%胎牛血清的缓冲液中，稀释度为0.1～10 μg/L)和内皮细胞条件培养液(每1 mL含10^6个细胞)。每孔50 μL，37℃温育2 h，充分洗涤，每孔加50 μL生物素标记的羊抗兔抗体(1∶100，武汉博士德公司)，37℃温育1 h。加生物素标记的过氧化物酶(1∶100，博士德)，37℃温育1 h。清洗3次，每孔加50 μL 3 mol/L H_2SO_4终止显色反应。酶标仪以空白板调零后，测量序列标准孔和样品孔在490 nm波长的光吸收率。条件培养液中MCP-1的浓度从MCP-1的标准曲线确定。

2　结果

2.1　联胺对单核细胞趋化蛋白-1 mRNA表达的影响

图1(Figure 1)显示，培养的内皮细胞不暴露于或暴露于联胺后，RNA杂交放射自显影图像显示出不同积分光密度的斑点。从表1(Table 1)可见，联胺作用后的MCP-1 mRNA表达水平较对照组明显增高。并且，随着作用时间的延长(2 h、4 h和8 h)各组内皮细胞MCP-1 mRNA表达水平逐渐增高，分别为对照组的2.26倍、2.41倍和2.72倍。

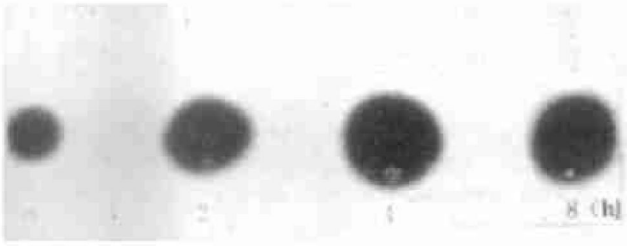

Figure 1. Expression of MCP-1 mRNA in EC exposed to diamide (5 μmol/L) for different times.

Table 1. Dot blot analysis of MCP-1 mRNA from EC exposed to diamide (5 μmol/L) at different intervals.

Groups	Time(h)	RIODV
Control	0	22.76
Diamide	2	51.76
	4	54.91
	8	62.11

RIODV: relative integral optical density value.

另一方面，使内皮细胞暴露于不同浓度的联胺(1 μmol/L、5 μmol/L 和 10 μmol/L)而温育时间相同(3 h)时，各组内皮细胞的 MCP-1 mRNA 表达水平则随联胺浓度的增加而增高，分别为对照组的 2.22 倍、2.97 倍和 3.32 倍(图 2 和表 2，Figure 2 and Table 2)。

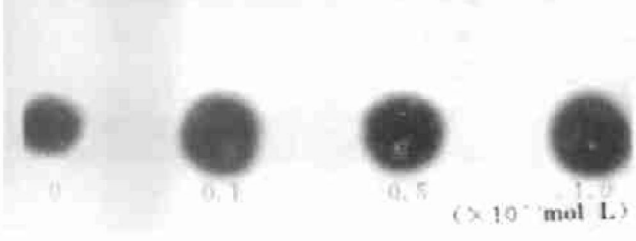

Figure 2. Expression of MCP-1 mRNA in EC exposed to different concentration of diamide for three hours.

2.2 联胺对内皮细胞产生单核细胞趋化蛋白-1 蛋白的影响

表 3(Table 3)显示，内皮细胞暴露于 5 μmol/L 的联胺后，随着作用时间的延长(2 h、4 h 和 8 h)，各组内皮细胞条件培养基中的 MCP-1 蛋白含量逐渐增加，分别为对照组的 2.18 倍、3.87 倍和 5.87 倍，其差异具统计学意义。

Table 2. Dot blot analysis of MCP-1 mRNA from EC exposed to different doses of diamide for 3 hours.

Groups	Dose(μmol/L)	RIODV
Control	0	21.83
Diamide	1	48.47
	5	64.91
	10	72.49

RIODV: relative integral optical density value.

Table 3. EC treated with diamide (5 μmol/L) produced MCP-1 in a time-dependent manner ($\bar{x}\pm s$, $n=6$, μg/L).

Groups	Time(h)	MCP-1 protein
Control	0	0.48±0.02
Diamide	2	1.05±0.1[a]
	4	1.86±0.2[b]
	8	2.82±0.2[c]

a: $P<0.01$, compared with control group; b: $P<0.05$, compared with 2 h diamide group; c: $P<0.01$, compared with 4 h diamide group.

另一方面，不同浓度的联胺(1 μmol/L、5 μmol/L 和 10 μmol/L)均作用 3 h 时，各组内皮细胞条件培养基中的 MCP-1 蛋白含量随联胺浓度增加而增加，分别为对照组的 2.34 倍、3.44 倍和 4.6 倍，其差异均具显著性意义(表 4，Table 4)。

Table 4. EC treated with diamide for 3 hours produced MCP-1 in a dose dependent manner ($\bar{x}\pm s$, $n=6$, μg/L).

Groups	Dose(μmol/L)	MCP-1 protein
Control	0	0.56±0.02
Diamide	1	1.31±0.2[a]
	5	1.93±0.3[b]
	10	2.58±0.1[c]

a: $P<0.01$, compared with control group; b: $P<0.05$, compared with 1 μmol/L diamide group; c: $P<0.01$, compared with 5 μmol/L diamide group.

3 讨论

单核细胞趋化蛋白-1作为一种强的特异性单核细胞趋化因子对As斑块形成,特别是对内膜单核细胞的聚集起着十分重要的作用。据报道,培养的内皮细胞可表达MCP-1 mRNA,并且其表达受许多因素的影响,如轻微修饰的低密度脂蛋白[5]、凝血酶[6]和单核细胞源性克隆刺激因子[7],甚至单核细胞与内皮细胞间相互作用亦可刺激培养的内皮细胞表达MCP-1 mRNA[1]。本研究结果表明,联胺可明显促进内皮细胞表达MCP-1 mRNA,并且在所加联胺的浓度不致引起内皮细胞剥脱性损伤的前提下,其MCP-1的表达对联胺的浓度及作用时间均有依赖性。

目前多数学者认为,内皮细胞损伤是As的始发因素,引起内皮细胞损伤的因素很多,近年来,内皮细胞脂质过氧化损伤与As关系日益受到重视[8]。脂质过氧化是一种自由基介导的细胞损伤机制[9],正常情况下,细胞内产生的自由基被细胞内酶性及非酶性抗氧化体系降解,使细胞内氧化物及抗氧化物得以保持动态平衡[10]。联胺是一种巯基氧化剂,可降低细胞内谷胱苷肽过氧化物酶活性[2],使细胞的抗氧化能力减弱,致使其发生脂质过氧化损伤。细胞过氧化脂质代谢的终产物丙二醛(melonaldehyde,MDA)的含量可以反映脂质过氧化物的水平。作者曾报道,联胺作用后的人脐静脉内皮细胞的丙二醛含量增加[11],证明联胺可引起内皮细胞的脂质过氧化损伤。

众所周知,动脉中膜平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)迁入内膜增殖以及血液中单核细胞迁入内皮下间隙是As发病过程中的早期重要事件。作者曾报道,联胺引起内皮细胞脂质过氧化损伤后,其条件培养液对SMC有明显的促有丝分裂活性[11];本实验结果显示,联胺可促进内皮细胞表达MCP-1,表明联胺诱发内皮细胞脂质过氧化后,可能通过多种途径促进As斑块的形成。这对阐明脂质过氧化诱发As的机制有重要重意义。

参考文献

1 Takahashi M, Masuyama JI, Ikeda U, et al. Induction of monocyte chemoattractant protein 1 synthesis in human monocytes during transendothelial migration in vitro. *Circ Res*, 1996, **76**(5): 759～767.

2 陈铁镇, 董玉兰. 内皮细胞脂质过氧化与动脉粥样硬化. 电子显微学报, 1991, **4**: 394～396.

3 Chemczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guandinium thiocyanate-phenl-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**(1): 156～159.

4 Evanoff HL, Burdick JA, Moore SA, et al. A sensitive ELISA for the detection of human monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1). *Immunol Invest*, 1992, **21**(1): 39～45.

5 Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, et al. Minimally modified low density lipoprotein induce monocyte chemoattractant protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**(13): 5134～138.

6 Colotta F, Sciacca FL, Sironi M, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 by mococytes and endothelial cells exposed to thrombin. *Am J Pathol*, 1994, **144**(5): 975～985.

7 Shyy YJ, Wickham LL, Hagen JP, et al. Human monocyte clony stimulating factor stimulates the gene expression of monocyte chemoattractant protein 1 and increases the adhesion of monocytes to endothelial monolayers. *J Clin Invest*, 1993, **92**(6): 1 745～751.

8 Hennig B, Chow CK. Lipid peroxidation and endothelial cell injury: Implication in atherosclerosis. *Free Radical Biol Med*, 1988, **4**(1): 99～103.

9 Cheeseman KM. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Molec Aspects Med*, 1993, **14**(2):191～197.

10 Dargel R. Lipid peroxidation: a common pathogenetic mechanism? *Exp Toxic Pathol*, 1992, **44**(4):169～181.

11 夏春枝, 邓仲端, 李丽珠, 等. 内皮细胞脂质过氧化损伤与平滑肌细胞增殖的关系. 中国动脉硬化杂志, 1996, **4**(3): 181～194.

(1997-09-11 收到)