

一氧化氮对肿瘤坏死因子- α 诱导的大鼠血管平滑肌细胞 细胞间粘附分子-1 表达的影响

张梅, 温进坤, 韩梅

(河北医科大学基础医学研究所生物化学研究室, 河北省石家庄市 050017)

[关键词] 一氧化氮; 肌, 平滑, 血管; 细胞间粘附分子-1; 单核细胞; 大鼠

[摘要] 为探讨肿瘤坏死因子- α 介导单核细胞与血管平滑肌细胞粘附致动脉粥样硬化及一氧化氮抗动脉粥样硬化的机制, 用体外培养的大鼠血管平滑肌细胞, 以硝普钠为一氧化氮供体, 采用细胞粘附实验、流式细胞术和逆转录-聚合酶链反应观察一氧化氮对肿瘤坏死因子- α 诱导的细胞间粘附分子-1 在血管平滑肌细胞中的表达及其对单核细胞与血管平滑肌细胞粘附的影响。结果发现一氧化氮显著抑制肿瘤坏死因子- α 诱导的单核细胞与血管平滑肌细胞的粘附及细胞间粘附分子-1 在血管平滑肌细胞中的表达, 减少血管平滑肌细胞表面的细胞间粘附分子-1。结果表明一氧化氮抑制细胞间粘附分子-1 基因表达及降低单核细胞与血管平滑肌细胞之间的粘附率是其抗动脉粥样硬化的机制之一。

[中图分类号] R364.5

[文献标识码] A

Influence of NO on Expression of Intercellular Adhesion Molecule-1 in Rat Vascular Smooth Muscle Cells

ZHANG Mei, WEN Jin-Kun, and HAN Mei

(Department of Biochemistry, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

MeSH Nitric Oxide; Muscle, Smooth, Vascular; Intercellular Adhesion Molecule-1; Monocytes; Rats

ABSTRACT **Aim** To investigate the influence of NO on expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vascular smooth muscle cells (VSMC) and adhesion between monocyte and VSMC induced by TNF- α . **Methods** Cell adhesion, flow cytometry and RT-PCR were applied to study effects of nitroprusside (SNP) and NO, on adhesion between monocyte and VSMC and expression of ICAM-1 gene. **Results** Adhesion between monocyte and VSMC was significantly inhibited by SNP.

Expression of ICAM-1 gene in VSMC induced by TNF- α was depressed after VSMC was treated with SNP, and level of ICAM-1 on VSMC was reduced.

Conclusions It is one of the mechanisms of anti-atherosclerosis by NO that expression of ICAM-1 gene in VSMC and adhesion between monocyte and VSMC induced by TNF- α could be inhibited by NO.

近年发现在动脉粥样硬化斑块中的平滑肌细胞也表达细胞间粘附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)^[1]。内皮细胞表达 ICAM-1 可介导循环中的白细胞粘附于血管内皮, 而动脉粥样硬化斑块中平滑肌细胞表达 ICAM-1 可导致白细胞与平滑肌细胞粘附增强, 并使已募集在损伤部位的白细胞停留, 有助于动脉粥样硬化形成过程中的慢性炎症反应^[2,3]。已经证实, 内皮源性舒血管物质一氧化氮 (nitric oxide, NO) 可通过下调 ICAM-1 在血管内皮

细胞中的表达, 抑制内皮细胞与白细胞之间的相互作用而发挥抗动脉粥样硬化作用^[4,5]。但 NO 对血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 表达 ICAM-1 及对白细胞与 VSMC 粘附的影响目前研究尚少, 本文对此进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

SD 大鼠由河北省实验动物中心提供。单核细胞系 THPY 由吉林大学白求恩医学院提供。硝普钠 (sodium nitroprusside, SNP) 为 Sigma 公司产品, 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 为德国 SBG 公司产品。引物由上海生工生物工程公司合成, 引物序列参考文献 [6]。ICAM-1 上游引物序列

[基金项目] 国家自然科学基金 (39970274) 及河北省自然科学基金 (301358)。

[作者简介] 张梅, 女, 1963 年出生, 博士研究生。温进坤, 男, 1954 年出生, 医学博士, 教授, 博士研究生导师。韩梅, 女, 1961 年出生, 医学博士, 教授, 博士研究生导师。

为 5'-GATGCTGACCCTGGAGAGCA-3', 下游为 5'-CAGGGACTTCCCATCCACCT-3'。内参照 β -Actin 上游引物序列为 5'-ACCACAGCTGACAGGGAAATCG-3', 下游为 5'-GAGGTCTTTACGCATGTCAACG-3'。总 RNA 提取及逆转录—聚合酶链反应试剂盒购于 Promega 公司。FITC-anti-ICAM-1 mAb 为 BD Pharmingen 公司产品。

1.2 平滑肌细胞的培养及分组

无菌取 6 周龄 SD 大鼠胸主动脉, 按贴块法^[7]分离培养主动脉 VSMC, 实验用第 4~8 代细胞。将 VSMC 随机分为对照组、TNF- α (10 μ g/L) 组和 TNF- α (10 μ g/L) + SNP (10^{-4} 、 10^{-3} 和 10^{-2} mol/L) 组。

1.3 单核细胞—血管平滑肌细胞粘附实验

将 VSMC 接种于 96 孔板, 待生长至 80% 融合时, 换成含 3% 胎牛血清 (FCS) M199 培养过夜。各组加入相应刺激因素, 继续培养 24 h 后弃培养液, 用 D-Hanks 液洗涤细胞 2 次。同时收集用含 10% FCS RPMI 1640 培养的单核细胞 THPY, 用无血清 RPMI 1640 悬浮并调整细胞浓度为 2×10^8 /L 后, 取 100 μ L 加入上述生长有 VSMC 的 96 孔板中。按文献[8]方法使 VSMC 与单核细胞粘附 2 h 后, 弃孔内培养液, 用 37 $^{\circ}$ C 生理盐水洗去未粘附的单核细胞。每孔加入 2% 刚果红 100 μ L, 室温染色 20 min, 弃染液, 用生理盐水轻洗 2 次, 加 PBS-乙醇液脱色后, 用酶标仪于 570 nm 测定各孔 OD 值。设 VSMC 孔和单核细胞孔为对照。每组实验设 3 复孔, 每一实验重复 4 次。粘附率的计算方法如下:

$$\text{粘附率} = \frac{\text{实验组 OD 值} - \text{VSMC 对照组 OD 值}}{\text{单核细胞对照组 OD 值}} \times$$

100%

1.4 流式细胞术

实验分组同上, 按上述条件对 VSMC 进行处理后, 用 0.25% 胰酶消化、PBS 收集细胞, 调整细胞数为 1×10^9 /L, 4% 多聚甲醛固定, PBS 洗 2 次, 加 100 μ L 1:100 FITC-anti-ICAM-1 mAb 避光冰上放置 30 min, 用 PBS 洗涤细胞, 将细胞过网后用流式细胞仪 (FACS420 美国 BD 公司) 检测细胞表面荧光强度, 波长为 520 nm, 每份样品计数 10 000 个细胞。用平均荧光强度代表细胞表面 ICAM-1 表达水平。

1.5 细胞总 RNA 提取及逆转录—聚合酶链反应

将 VSMC 接种于 24 孔板, 待生长至 80% 融合, 换成含 3% FCS M199 培养 24 h, 加 TNF- α (10 μ g/L) 或 TNF- α (10 μ g/L) + SNP (10^{-3} mol/L), 继续培养 6 h。用异硫氰酸胍—酚—氯仿一步法提取细胞总 RNA。逆转录—聚合酶链反应按说明书进行, 即加 AMV/

Tfl 5 \times 缓冲液 10 μ L、dNTP 1 μ L (0.2 mmol/L)、ICAM-1 上下游引物各 1 μ L (1 μ mol/L)、 β -Actin 上下游引物各 1 μ L (1 μ mol/L)、25 mmol/L MgSO₄ 2 μ L、AMV 逆转录酶 5 u、Tfl DNA 聚合酶 5 μ L 和 2 μ L RNA, 补水至 50 μ L。48 $^{\circ}$ C 保温 45 min 逆转录合成第一股 cDNA, 94 $^{\circ}$ C 加热 2 min 灭活 AMV 逆转录酶并使 RNA/cDNA/引物变性之后, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 68 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 40 个循环后 68 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后用 Eagle Eye II 凝胶系统分析仪观察并照相。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 硝普钠对单核细胞与血管平滑肌细胞粘附的影响

如表 1 (Table 1) 所示, 在 10 μ g/L TNF- α 的作用下, VSMC 与单核细胞的粘附作用显著增强 (粘附率升高 1 倍左右)。在所观察的浓度范围内, 各种浓度 SNP 均可显著抑制 TNF- α 诱导的两种细胞之间的粘附, 且随 SNP 浓度的增加其对细胞粘附的抑制作用增强, 在 SNP 浓度为 10^{-2} mol/L 时, 两种细胞的粘附率已降至接近对照组水平。

表 1. 不同浓度硝普钠 (mol/L) 对 10 μ g/L 肿瘤坏死因子诱导的单核细胞与血管平滑肌细胞粘附的影响

Table 1. Effect of SNP (mol/L) on adhesion between VSMC and monocyte induced by TNF- α (μ g/L) ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Groups	Adhesion (%)
Control	10.5 \pm 0.8
TNF- α	20.2 \pm 1.4 ^a
TNF- α + SNP (10^{-4} /mol/L)	16.2 \pm 2.3 ^b
TNF- α + SNP (10^{-3} /mol/L)	14.4 \pm 1.4 ^b
TNF- α + SNP (10^{-2} /mol/L)	11.5 \pm 1.4 ^b

a: $P < 0.01$, compared with control group, b: $P < 0.01$, compared with TNF- α group.

2.2 硝普钠对血管平滑肌细胞表面细胞间粘附分子-1 表达的影响

流式细胞术结果显示, TNF- α 可使 VSMC 表面 ICAM-1 表达明显增加, SNP 明显抑制 TNF- α 诱导的 VSMC 表达 ICAM-1 ($P < 0.01$), 且呈浓度依赖性, 当 SNP 浓度增加至 10^{-2} mol/L 时 VSMC 表面 ICAM-1 的表达接近对照组 (图 1, Figure 1)。

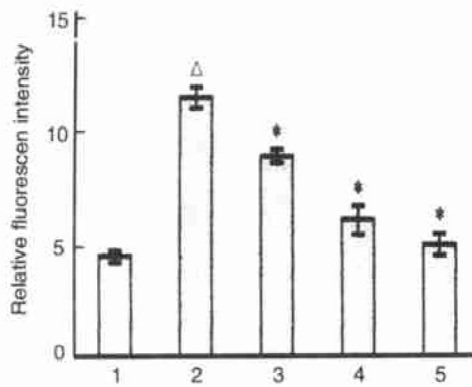


图 1. 硝普钠对血管平滑肌细胞表面细胞间粘附分子 1 的影响

Figure 1. Effect of SNP on VSMC ICAM-1. $P < 0.01$, Δ : compared with control group; *: compared with TNF- α group.

2.3 硝普钠对血管平滑肌细胞细胞间粘附分子 1 mRNA 的影响

如图 2(Figure 2) 所示, 对照组中几乎检测不到 ICAM-1 mRNA; 10 $\mu\text{g/L}$ TNF- α 作用于 VSMC 6 h 后有明显的 ICAM-1 mRNA 扩增带, 扩增带的长度与预期结果相一致。在加入 TNF- α 的同时加入 SNP (10^{-3} mol/L) 可显著抑制 ICAM-1 基因表达, 使其 mRNA 水平比单纯用 TNF- α 刺激的细胞降低 50% 以上。

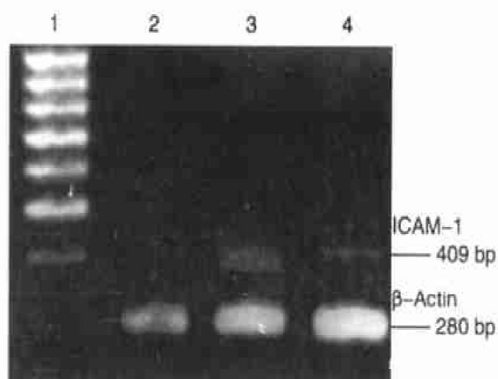


图 2. 硝普钠对肿瘤坏死因子诱导的血管平滑肌细胞细胞间粘附分子 1 mRNA 表达的影响

Figure 2. Effect of SNP on expression of ICAM-1 mRNA in VSMC induced by TNF- α . 1: Marker; 2: Control; 3: TNF- α ; 4: TNF- α + SNP.

3 讨论

血管内皮产生的 NO 不但可抑制多种血液成分如血小板、淋巴细胞、中性粒细胞和单核细胞粘附于血管内皮细胞, 而且还具有抗血管壁细胞增殖的作用, 从而对动脉粥样硬化形成发挥抑制作用。Spiecker 等^[9] 以 SNP 为供体产生外源性 NO, 可有效抑制

白细胞介素-1 β 对人脐静脉内皮细胞 ICAM-1 的诱导表达。本文发现在 SNP 浓度为 10^{-4} mol/L~ 10^{-2} mol/L 范围内可显著抑制炎症细胞因子 TNF- α 对 VSMC 表达 ICAM-1 的诱导作用, 降低单核细胞与 VSMC 之间的粘附率, 从而证实 NO 不仅可抑制 ICAM-1 在血管内皮细胞中的表达, 而且对其在 VSMC 中的表达也具有下调作用。提示 NO 抑制白细胞与 VSMC 之间的粘附是通过抑制 ICAM-1 在 VSMC 中的表达而实现的。本研究为 NO 抗动脉粥样硬化补充了新的作用机制。关于 NO 调节 ICAM-1 基因表达的机制, 可能与其活化转录抑制因子有关^[10], 尚需进一步深入研究。

参考文献

- [1] Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques [J]. *Am J Pathol*, 1992, **140**: 665-673
- [2] Wang XK, Feuerstein GZ, Clark RK, et al. Enhanced leucocyte adhesion to interleukin-1 stimulated vascular smooth muscle cells is mainly through intercellular adhesion molecule-1 [J]. *Cardiovasc Res*, 1994, **28**: 1 808-814
- [3] Wang XK, Feuerstein GZ, Gu JL, et al. Interleukin-1 induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells [J]. *Atherosclerosis*, 1995, **115**: 89-98
- [4] De Caterina R, Libby P, Peng HB, et al. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation [J]. *J Clin Invest*, 1995, **96**: 60-68
- [5] Gauthier TW, Scalia R, Murohara T, et al. Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**: 1 652-659
- [6] Hellerbrand C, Jobin C, Licato LL, et al. Cytokines induce NF- κ B in activated but in quiescent rat hepatic stellate cells [J]. *Am J Physiol*, 1998, **275** (2Pt1): G269-278
- [7] 胡静, 温进坤. 内皮素受体反义寡核苷酸对内皮素受体基因表达及血管平滑肌细胞增殖的影响 [J]. *生物化学杂志*, 1996, **12** (2): 157-160
- [8] 沈茜, 姜爱琴, 吴弘. 细胞因子对心脏微血管内皮细胞与淋巴细胞黏附的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 1998, **14** (6): 620-623
- [9] Spiecker M, Darius H, Fisch A, et al. Nitric oxide donors inhibit cytokine induced intercellular adhesion molecule-1 expression on human endothelial cells [J]. *Circulation*, 1995, **92** (SII): IF-506
- [10] Spiecker M, Darius H, Kaboth K. Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by NO donors and antioxidants [J]. *J Leukoc Biol*, 1998, **63** (6): 732-739

(此文 2001-05-20 收到, 2001-11-12 修回)

(此文编辑 朱雯霞)