论著

文章编号:1000-5404(2007)17-1682-03

# 单核细胞趋化蛋白-1对人脐静脉内皮细胞凋亡的影响

李琴山,刘 洋,冯赞杰,张亚玲,钱民章 (遵义医学院基础部生物化学教研室,遵义 563000)

**提 要:目的** 研究单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, hUVEC)凋亡的影响。**方法** 培养并鉴定人脐静脉内皮细胞;用不同浓度MCP-1(0.1、1.0、10、100 μg/L)对其作用24、48 h;先用MTT比色法观察细胞存活率、流式细胞技术检测细胞DNA含量及细胞周期观察其对hUVEC凋亡的影响。**结果** 单核细胞趋化蛋白-1能诱导人脐静脉内皮细胞的凋亡($P<0.05$),其效应随浓度和时间的增加而增强:MTT明显减低;细胞DNA含量减少,出现明显亚$G_0/G_1$峰(凋亡细胞峰)。**结论** 单核细胞趋化蛋白-1能诱导人脐静脉内皮细胞凋亡。

**关键词:** 单核细胞趋化蛋白-1;人脐静脉内皮细胞;凋亡;动脉粥样硬化

**中图法分类号:** R329.26; R322.12; R344.81 **文献标识码:** A

# Monocyte chemotactic protein-1 induces the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells

LI Qin-shan, LIU Yang, FENG Zan-jie, ZHANG Ya-ling, QIAN Min-zhang (Department of Biochemistry, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

**Abstract:** Objective To study the effects of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) on the growth of human umbilical vein endothelial cells (hUVEC). Methods hUVEC were cultured *in vitro* and identified. hUVEC that grew vigorously were stimulated for 24 h or 48 h respectively with MCP-1 (0.1, 1.0, 10, and 100 μg/L). The survival rate of hUVEC was first detected by MTT assay. The cell cycle and DNA content were detected and analyzed by flow cytometry. Results hUVEC were isolated from human umbilical veins and cultured, and then identified by immunofluorescence and immunohistochemistry with factor Ⅷ and KDR. MCP-1 induced the apoptosis of hUVEC in a dose-dependentmanner and a time-dependentmanner ($P<0.05$). Compared with control group, MTT and chromosomal DNA content decreased significantly. Conclusion MCP-1 can induce the apoptosis of hUVEC.

**Key words:** monocyte chemotactic protein-1; human umbilical vein endothelial cell; apoptosis; atherosclerosis

动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)病变发生在动脉血管壁上,始于血管内皮细胞(vascular endothelial cell,VEC)损伤。血管内皮细胞不仅是血管内膜的一道重要屏障,还能分泌多种活性因子,参与AS的发生与发展[1]。实验证明发生AS的局部血管内皮细胞更新加快,提示高频率的内皮细胞凋亡是AS发生的第一步[2]。有学者认为内皮细胞的凋亡在AS的早期扮演了重要角色[3]。

单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)是作用很强的趋化激活剂,在AS的发生、发展中具有重要作用。体外实验证明[4],内皮细胞、血管平滑肌细胞及迁入内膜的单核/巨噬细胞,均可表达MCP-1 mRNA和蛋白,但MCP-1能否影响与As发生关系极为密切的内皮细胞的生长,国内外就此问题少见相关报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

人MCP-1(Peprotech公司),M199、胎牛血清(Gibco公司),MTT(Amresco公司),胰蛋白酶、Ⅱ型胶原酶、EDTA(Sigma公司);CycleTEST™ PLUS DNA Kit(美国BD公司),鼠抗人Ⅷ因子抗体、鼠抗人内皮细胞生长因子受体2(KDR)抗体(美国Dako公司);超净台(苏州苏净集团安泰空气公司)、倒置相差显微镜

基金项目:贵州省科学技术基金(2003-3015)
Supported by the Research Funds by Sci & Tech Department of Guizhou Province (2003-3015)

作者简介:李琴山(1976-),男,贵州省余庆县人,硕士,讲师,主要从事心血管疾病分子生物学方面的研究。电话:(0852)8609445, E-mail:lqs004@yahoo.com.cn

通讯作者:钱民章,电话:(0852)8609792, E-mail: Qian_mzh@hotmail.com

收稿日期:2006-07-05;修回日期:2006-12-11

（日本 Nikon 公司）、$CO_2$ 孵箱（美国 Thermo Formo 公司）、酶标仪（德国 Huma Reader 公司）、流式细胞仪（美国 BD 公司）。

### 1.2　实验方法

1.2.1　人脐静脉内皮细胞培养　　采用我室改良的酶消化法进行细胞培养[5]，用内皮细胞特异性Ⅷ因子抗体（抗 von Willebrand 因子抗体）以及 KDR 单克隆抗体免疫细胞化学法鉴定内皮细胞。本实验所用细胞均为第 3 代。

1.2.2　实验分组　　共分 5 组，阴性对照组：10 ml/L 胎牛血清的 M199 组；实验组 M1（0.1 μg/L MCP-1）；M2（1.0 μg/L MCP-1）；M3（10 μg/L MCP-1）；M4（100 μg/L MCP-1）。

1.2.3　MTT 法观察细胞存活率　　hUVEC 以 $5\times10^3$ 细胞/孔接种于 96 孔板中，24 h 后换为含 1% 胎牛血清的 M199 培养基同步化 12 h 后，换为 100 μl 不同终浓度的 MCP-1 应用液，设无细胞的空白对照组，将 96 孔板放入 $CO_2$ 孵箱中分别孵育 20 h、44 h。取出 96 孔培养板，每孔加入 20 μl MTT（5 g/L），37 ℃继续孵育 4 h，终止培养。吸弃各孔培养液，每孔加入 100 μl 的二甲基亚砜，振荡 10 min，在酶标仪上测定各孔吸光度值[$D$(570)]。

1.2.4　流式细胞仪分析细胞生长周期及细胞 DNA 含量的变化　　hUVEC 以 $1\times10^6$/瓶接种于 50 ml 无菌的培养瓶中，孵育 24 h 后用含 1% 胎牛血清的 M199 同步化 12 h 后，换为不同终浓度的 MCP-1 应用液，分别作用 24、48 h 后，终止培养。胰酶消化，离心，收集细胞用流式细胞仪检测 DNA 含量的变化及分析细胞周期，所得细胞凋亡结果经 BD 公司 Cell Quest 和 Mod FITLT for mac V1.01 软件分析处理。

### 1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析及 $t$ 检验。

## 2　结果

### 2.1　细胞培养与鉴定

培养的细胞在显微镜下观察，细胞呈典型的“铺路石”样结构特征（图 1）。Ⅷ因子单克隆抗体免疫细胞化学结果显示 95% 为阳性血管内皮细胞，细胞细胞质为棕黄色（图 2）。GAM-FITC 绿色荧光显示膜上 KDR（Anti-VEGF recepter-2）（图 3）和 GAR-TR 红色荧光显示胞内的Ⅷ因子（图 4），免疫荧光双标显示 95% 以上为阳性血管内皮细胞。证明所培养的细胞为血管内皮细胞，并且纯度符合实验要求。

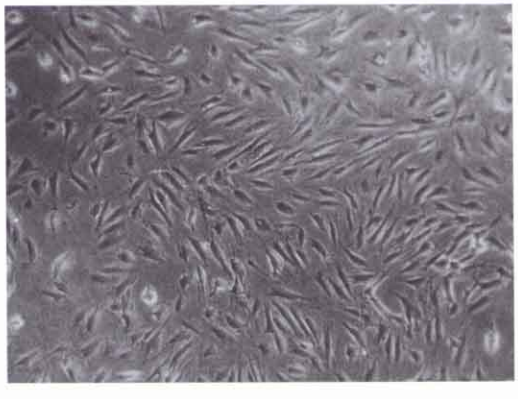


**图 1　原代培养的脐静脉内皮细胞倒置相差显微镜观察**　（×100）



**图 2　Ⅷ因子免疫细胞化学检测阳性**　（倒置相差显微镜×100）

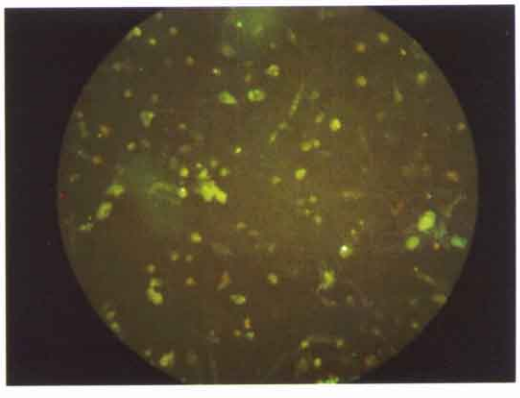


**图 3　KDR 免疫荧光检测阳性**　（荧光显微镜×100）

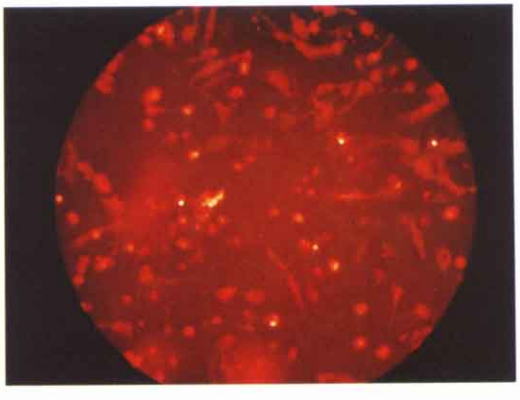


**图 4　Ⅷ因子免疫荧光检测阳性**　（荧光显微镜×100）

### 2.2　MTT 结果

MCP-1 作用 24、48 h 后，用酶标仪检测 $D$(570)，结果显示，不同浓度的 MCP-1 均可使细胞存活率明显降低（$P<0.05$，$P<0.01$），并呈剂量和时间依赖关系（表 1）。

**表 1　不同浓度的 MCP-1 诱导 hUVEC 24 h 和 48 h 的 MTT 值（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）**

| 组别 | $D$(570)（24 h） | $D$(570)（48 h） |
|---|---|---|
| 对照组 | 0.561 ± 0.016 | 0.526 ± 0.007 |
| M1（0.1 μg/L MCP-1） | 0.512 ± 0.017[a] | 0.491 ± 0.007[a] |
| M2（1 μg/L MCP-1） | 0.470 ± 0.027[b] | 0.445 ± 0.025[b] |
| M3（10 μg/L MCP-1） | 0.400 ± 0.021[b] | 0.369 ± 0.011[b] |
| M4（100 μg/L MCP-1） | 0.349 ± 0.022[b] | 0.307 ± 0.017[b] |

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

### 2.3 MCP-1 对 hUVEC 细胞周期及细胞 DNA 含量的影响

MCP-1 作用24、48 h 后，经 PI 染液染色，流式细胞术测定 DNA 含量并分析细胞周期，用 BD 公司 Cell Quset 软件分析，结果表明不同浓度的 MCP-1 作用后，DNA 含量明显减少，出现明显的亚 $G_0/G_1$ 峰（$P<0.05$，$P<0.01$），且这种诱导作用呈剂量和时间依赖关系，表明 MCP-1 诱导了 hUVEC 的凋亡。但 MCP-1 对细胞周期各期细胞百分比的影响在统计学上无显著差异（$P>0.05$）（表2）。

**表2 不同浓度的 MCP-1 作用 hUVEC 24h 和 48h 对细胞周期和凋亡的影响（$n=3$，%，$\bar{x}\pm s$）**

| 组别 | $G_0/G_1$ (24 h) | $G_0/G_1$ (48 h) | 细胞凋亡率 (24 h) | 细胞凋亡率 (48 h) |
|---|---|---|---|---|
| 对照组 | 90.32±1.89 | 88.93±0.75 | 0.38±0.34 | 3.19±1.31 |
| M1(0.1 μg/L MCP-1) | 84.57±2.04 | 90.75±2.68 | 5.67±1.64[a] | 11.65±1.91[a] |
| M2(1 μg/L MCP-1) | 83.11±2.54 | 94.06±0.82 | 14.02±3.07[b] | 21.68±1.97[b] |
| M3(10 μg/L MCP-1) | 91.96±0.99 | 93.73±3.33 | 25.11±2.48[b] | 37.92±6.45[b] |
| M4(100 μg/L MCP-1) | 95.55±1.23 | 77.55±3.54 | 44.35±3.90[b] | 56.62±7.37[b] |

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

## 3 讨论

血管内皮细胞是参与动脉粥样硬化病理过程的重要细胞，实验证明发生 AS 的局部血管内皮细胞更新加快，提示高频率的内皮细胞凋亡是 AS 发生的第一步，凋亡内皮细胞的增加易改变内皮的完整性和功能，从而诱发 AS[6]。因此 VEC 凋亡在 AS 中的作用越来越受到关注。

单核细胞趋化蛋白-1 为一种趋化激活剂，在动脉粥样硬化斑块中有很高的表达，已证实多种促进动脉粥样硬化的刺激因素均可引起 MCP-1 的高表达[7-9]。新的研究表明，MCP-1 不仅是趋化激活剂，参与了 AS 及多种炎性疾病的发生，而且可以作为一种生长因子促进 VSMC 的增殖[10-12]，从而直接或间接地参与了 AS 的形成。因此研究 MCP-1 在 AS 发病机制中除趋化作用外的功能及机制对认识和防治 AS 十分重要。

本实验用不同浓度 MCP-1 作用于原代培养的人脐静脉血管内皮细胞（来源于人体、更接近于体内细胞的生理特性）24、48 h，观察其对 VEC 生长的影响，实验先用 MTT 比色法观察到 MCP-1 降低了 hUVEC 的存活率，在此基础上，用流式细胞技术检测细胞周期及 DNA 含量，观察到 DNA 含量减少并出现明显的亚 $G_0/G_1$ 峰（细胞凋亡峰），提示 MCP-1 诱导了 hUVEC 凋亡，并且 MCP-1 的这种促 hUVEC 凋亡的效应随着其浓度和时间的增加而增强。在 AS 发病中多种因素可刺激 MCP-1 表达增加，MCP-1 可通过诱导 hUVEC 的凋亡加重 AS 病变，这从一个新的角度探讨了 MCP-1 致 AS 的机制，对认识 MCP-1 的多种生物学功能有重要意义，同时也为 AS 的发病机制研究提供了新的资料。

## 参考文献：


[1] 卢志顺，余 晓，唐俊利，等. 胆固醇对血管内皮细胞的损伤[J]. 第三军医大学学报，2006，28(16)：1679-1681.

[2] Dimmeler S, Hermann C, Zeiher A M. Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of atherosclerosis? [J]. Eur Cytokine Netw, 1998, 9(4): 697-698.

[3] Bachetti T. Endothelial dysfunction in chronic heart failure: some new basic mechanisms[J]. Ital Heart J, 2000, 1(10): 656-661.

[4] Ichiki T, Funakoshi Y, Ito K, *et al*. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 by nonenzymatically glycated albumin (Amadori adducts) in vascular smooth muscle cells[J]. Bioche Biophys Res Commun, 2000, 269(3): 666-670.

[5] 李琴山，冯赞杰，刘 洋，等. 一种改进的人脐静脉内皮细胞的培养方法[J]. 第四军医大学学报，2007，28(3)：276-278.

[6] Choy J C, Granville D J, Hunt D W, *et al*. Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis [J]. J Mol Cell Cardiol, 2001, 33(9): 1673-1690.

[7] Chen Y L, Chang Y J, Jiang M J. Monocyte chemotactic protein-1 gene and protein expression in atherogenesis of hypercholesterolemic rabbits[J]. Atherosclerosis, 1999, 143(1): 115-123.

[8] Cushing S D, Berliner J A, Valente A J, *et al*. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990, 87(13): 5134-5138.

[9] Takaishi H, Taniguchi T, Takahashi A, *et al*. High glucose accelerates MCP-1 production *via* p38 MAPK in vascular endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 305(1): 122-128.

[10] Selzman C H, Miller S A, Zimmerman M A, *et al*. Monocyte chemotactic protein-1 directly induces human vascular smooth muscle proliferation[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 283(4): H1455-H1461.

[11] Porreca E, Di-Febbo C, Reale M, *et al*. Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) is a mitogen for cultured rat vascular smooth muscle cells[J]. J Vasc Res, 1997, 34(1): 58-65.

[12] 官秀梅，钱民章. 单核细胞趋化蛋白1对人脐静脉平滑肌细胞增殖的影响[J]. 中国动脉硬化杂志，2005，13(3)：309-312.


（编辑 张大春）