基础研究 文章编号：0253-3626（2011）09-1063-03

内皮细胞微粒对人脐静脉内皮细胞 VCAM-1 和 ICAM-1 表达的影响

陆永光[1]，苏 强[2]，曾晓聪[2]，严 华[1]，黄军章[1]，符春晖[1]
（1. 钦州市第二人民医院心内科，钦州 535000；2. 广西医科大学第一附属医院心内科，南宁 530021）

【摘 要】目的：探讨内皮细胞微粒（Endothelial microparticles，EMPs）对人脐静脉内皮细胞（Human umbilical vein endothelial cells，HUVECs）血管细胞粘附分子-1（Vascular cellular adhesion molecule-1，VCAM-1）和细胞间粘附分子-1（Intercellular adhesion molecule 1，ICAM-1）表达的影响。方法：取生长良好的第 4、5 代 HUVECs，将细胞以 1×10^5 个/ml 密度接种于 5 cm^2 的培养皿中，待细胞生长近 80%融合时进行干预。按 0、1×10^2、1×10^3、1×10^4、1×10^5 个/ml 浓度的 EMPs 进行分组及刺激，每组 12 个样本。在共同培养 24 h 后收集细胞。分别采用实时荧光定量聚合酶链反应和蛋白免疫印迹方法检测 VCAM-1 和 ICAM-1 mRNA 和蛋白的表达。结果：HUVECs 受 EMPs 刺激，VCAM-1 和 ICAM-1 mRNA 及蛋白表达显著增加，且 EMPs 的这种作用呈浓度依赖性增强（均 $P<0.05$）。结论：EMPs 能上调 HUVECs VCAM-1 和 ICAM-1 的表达，EMPs 不仅是内皮功能障碍的标记物，还能加重内皮功能损害。

【关键词】内皮细胞微粒；脐静脉内皮细胞；血管细胞粘附分子-1；细胞间粘附分子-1
【中国图书分类法分类号】R541 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-03-01

Effects of endothelial microparticles on expressions of VCAM-1 and ICAM-1 in human umbilical vein endothelial

LU Yong-guang[1], SU Qiang[2], ZENG Xiao-cong[2], YAN Hua[1], HUANG Jun-zhang[1], FU Chun-hui[1]
(1. Department of Cardiology, the Second People's Hospital of Qinzhou; 2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University)

【Abstract】*Objective*: To examine the effects of endothelial microparticles (EMPs) on the expressions of vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule (ICAM-1) in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Methods*: HUVECs at passage 4 to 5 were incubated for 24 h with EMPs ($0, 1\times10^2, 1\times10^3, 1\times10^4, 1\times10^5$/ml). Quantitative real-time polymerase chain reaction and Western blotting were used to detect expressions of mRNA and protein of ICAM-1 and VCAM-1 respectively. *Results*: Both two detection methods showed that EMPs stimulation significantly induced the mRNA and protein expressions of VCAM-1 and ICAM-1 in HUVECs in a dose-dependent manner. *Conclusion*: EMPs can induce the expressions of VCAM-1 and ICAM-1 in a dose-dependent manner. These findings suggest that EMPs may have adverse effects in modulating inflammatory response in atherosclerosis.

【Key words】endothelial microparticles; human umbilical vein endothelial cells; vascular cell adhesion molecule 1; intercellular adhesion molecule 1

内皮细胞微粒（Endothelial microparticles，EMPs）是内皮细胞在各种病理因素刺激下激活或凋亡所释放出的微小囊泡，可有效反映内皮的结构完整性和功能状态[1]。研究表明，冠心病患者外周血 EMPs 与细胞间粘附分子-1（Intercellular adhesion molecule-1，ICAM-1）的升高具有密切的相关性。因此，EMPs 可做为评估内皮功能障碍和炎症反应的程度的指标[2]。此外，EMPs 具有生物活性，可以作为细胞介质和粘附分子的载体，介导细胞信号的转导和效能的发挥，参与了炎症、凝血及血管功能调节等过程[3,4]。但是，EMPs 对内皮细胞分泌炎性介质的影响尚不完全清楚。本研究通过观察 EMPs 对人脐静脉内皮细胞（Human umbilical vein endothelial cells，HUVECs）、血管细胞粘附分子-1（Vascular cellular adhesion molecule-1，VCAM-1）和 ICAM-1 表达的影响，以探讨 EMPs 在心血管疾病内皮功能障碍和炎症反应中的作用及机制。

作者介绍：陆永光（1977-），男，主治医师，博士，研究方向：冠心病诊治。
通信作者：符春晖，男，主任医师，Email:drfuchunhui@hotmail.com。
基金项目：广西壮族自治区卫生厅自筹经费资助项目（编号：Z2011103）。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 人脐静脉内皮细胞系 ECV-304(美国ATCC公司)，改良型 1640 培养基(美国 Hyclone 公司)，Ⅱ型胶原酶、胰蛋白酶(美国 GIBCO 公司)，胎牛血清(杭州四季青公司)，TNF-α(英国 PeProtech 公司)，PCR 引物(上海生物工程技术有限公司)，Trizol (北京天根生化科技有限公司)，氯仿、异丙醇、无水乙醇(成都科龙化工试剂厂)，First-Strand cDNA Synthesis 试剂盒、All-in-OneTM qPCR Mix(美国GeneCopoeia公司)，山羊抗人 VCAM-1 和 ICAM-1 多克隆抗体(美国 Biolegend 公司)，异氰酸荧光素(FITC)标记的 CD42 单克隆抗体、藻红蛋白(PE)标记的 CD31 单克隆抗体(美国 Proteintech Group 公司)，0.8、3.0 μm 标准微粒(美国 Duke 公司)。

1.1.2 HUVECs 的传代与培养 取 HUVECs 细胞株 ECV-304复苏后，于 37℃、5%CO_2 的培养箱中培养传代至 4~5 代细胞，将细胞以 1×10^5 个/ml 接种于 24 孔板中待细胞接近 80%融合时进行干预。将细胞按 EMPs 浓度分为 5 组，每组 12 孔。各组分别加入终浓度为 0、1×10^2、1×10^3、1×10^4、1×10^5 个/ml 的 EMPs 进行刺激。共同培养 24 h 后收集细胞，以用于后续实验。

1.1.3 EMPs 的制备和鉴定 参照既往研究的方法以 TNF-α 刺激制备 EMPs。用 100 ng/ml TNF-α 在 37℃孵育刺激 HUVECs 48 h，收集培养液上清，以 4 300 g 离心 5 min 以去除细胞及细胞碎片，随后将上清液在 10℃，20 000 g 离心 2 h。用 PBS 洗涤沉淀 2 次，然后以 1 ml PBS 重悬微粒。取 50 μl 加入分别用异氰酸荧光素(FITC)标记的 CD42 单克隆抗体和藻红蛋白(PE)标记的 CD31 单克隆抗体，同时于对照管中加入等量的对照抗体(mice IgG1)，室温下孵育 15 min，洗涤 2 次后，加入 100 μl PBS 液后即上流式细胞仪检测。以 0.8 μm 和 3 μm 的标准微球作内参对照，0.8 μm 乳胶微粒用于设门，3.0 μm 乳胶微粒用于定量。每个样本在上机之前加入 10 000 个直径为 3 μm 的微球，当收集 20 000 个 3.0 μm 标准微粒后停止计数，作为计数参照标准计算出 EMPs 浓度。EMPs 定义为直径小于 1.0 μm 且 $CD31^+/CD42^-$阳性的微粒。

1.2 实验方法

1.2.1 实时荧光定量 PCR 检测 VCAM-1 和 ICAM-1 mRNA 的表达 收集细胞，用 Trizol 提取总 RNA，并进行反转录合成 cDNA。建立 qPCR 反应体系。VCAM-1、ICAM-1 及内参照 β-actin 引物(上海生工生物有限公司合成)见表 1。PCR 反应步骤如下：95℃变性 10 min；40 个循环(95℃，10 s；60℃，20 s；72℃，31 s)。扩增反应结束后，从 72℃缓慢加热到95℃，以建立 PCR 产物的熔解曲线。每个标本均设置复管 PCR 反应。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行数据分析，$\Delta\Delta Ct=(Ct_{目的基因}-Ct_{内参基因})$实验组$-(Ct_{目的基因}-Ct_{内参基因})_{对照组}$，以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 作为实验组相对于对照组的变化倍数。

1.2.2 蛋白免疫印迹检测 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白的表达 收集各组 HUVECs 细胞，加入裂解液提取细胞总蛋白，Bradford 法测定蛋白的浓度。取蛋白样品于 10%聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离，待电泳完毕将蛋白转至硝酸纤维素膜上。在室温下脱用脂奶粉封闭后，分别加入山羊抗人 VCAM-1 和 ICAM-1 多克隆抗体(1:300)，4℃孵育过夜。漂洗后加辣根过氧化物酶二抗(1:3 000)37℃孵育 1 h。加入 ECL 发光剂，暗室 X 光胶片曝光，显影。用 Quantity One 软件分析目标条带的灰度值，以目标条带灰度值与内参条带灰度值的比值作为目的基因蛋白的相对表达量。

表 1 VCAM-1、ICAM-1 和 β-actin 基因实时荧光定量 PCR 序列

基因		引物序列
VCAM-1	上游引物	5'-CTCCGTCTCATTGACTTGC-3'
	下游引物	5'-GAACAGGTCATGGTCACAG-3'
ICAM-1	上游引物	5'-CCGGAAGGTGTATGAACTG-3'
	下游引物	5'-TCCATGGTGATCTCTCCTC-3'
β-actin	上游引物	5'-TGACGTGGACATCCGCAAAG-3'
	下游引物	5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行统计学分析。计量数据正态分布以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，多组间比较方差不齐，采用 *Kruskal-Wallis* 秩和检验，两两比较采用 *Nemenyi* 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 VCAM-1 和 ICAM-1 mRNA 的表达

实时荧光定量 PCR 结果显示，与 0 个/ml 组比较，10^3 个/ml 组、10^4 个/ml 组、10^5 个/ml 组 VCAM-1 和 ICAM-1 的 mRNA 表达显著增高(均 $P<0.01$)，且 10^4 个/ml 组高于 10^3个/ml 组($P<0.01$)，10^5 个/ml 组高于 10^4 个/ml($P<0.01$)，见表 2。

表 2 VCAM-1、ICAM-1 mRNA 的表达($\bar{x}\pm s$，$n=12$)

EMPs 浓度(个/ml)	VCAM-1	ICAM-1
0	1.03 ± 0.04	1.04 ± 0.04
10^2	1.13 ± 0.22	1.15 ± 0.08
10^3	1.42 ± 0.28 ^{ab}	1.38 ± 0.20 ^{ab}
10^4	1.86 ± 0.31 ^{abc}	1.80 ± 0.26 ^{abc}
10^5	2.62 ± 0.47 ^{abcd}	2.44 ± 0.34 ^{abcd}
P	<0.001	<0.001

注：a，$P<0.01$ 与 0 个/ml 组相比；b，$P<0.01$ 与 10^2 个/ml 组相比；c，$P<0.01$ 与 10^3 个/ml 组相比；d，$P<0.01$ 与 10^4 个/ml 组相比

2.2 VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白的表达

蛋白免疫印迹检测结果显示，与 0 个/ml 组比较，10^3 个/ml 组、10^4 个/ml 组、10^5 个/ml 组 VCAM-1 和 ICAM-1 的蛋白表达显著增高(均 $P<0.05$)，且 10^4 个/ml 组高于 10^3 个/ml 组($P<0.01$)，10^5 个/ml 组高于 10^4 个/ml($P<0.01$)，见表 3 和图1。

3 讨 论

动脉粥样硬化是一种慢性炎症反应性疾病[5]，在脂质代