DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.09.001
第22卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 9
2000年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2000

文章编号:1000-5404(2000)09-0815-04

论著

MCP-1 McAb和Losartan拮抗VSMCs的增殖与迁移效应的实验研究

何作云,李爱民 (第三军医大学附属新桥医院心血管内科,重庆 400037)

提 要:目的 探讨单核细胞趋化蛋白-1单克隆抗体(MCP-1 McAb)或Losartan拮抗血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)介导的血管平滑肌细胞(VSMCs)增殖与迁移效应的可能性,为防治动脉硬化(AS)提供一定的理论依据。方法 采用改良的Boyden小室法检测VSMCs的迁移效应;以MTT法、^{3}H-TdR掺入法、^{3}H-脯氨酸标记法和VSMCs计数评价VSMCs的增殖效应;将培养的VSMCs分为5组:2%胎牛血清(2%FCS)组、AngⅡ组(其浓度为10^{-10}~10^{-6} mol/L)、Losartan组(其浓度为10^{-7}~10^{-5} mol/L)、MCP-1 McAb组(终浓度为10 μg/ml)和阳性对照组(含5%的酵母多糖活化血清)。结果 ①AngⅡ具有剂量依赖性的促进VSMCs增殖与迁移效应;②MCP-1 McAb或Losartan能有效地拮抗AngⅡ介导的VSMCs增殖与迁移效应。结论 MCP-1 McAb或Losartan对动脉硬化性疾病可能具有较大的应用前景。

关键词:血管平滑肌细胞;增殖;迁移;单核细胞趋化蛋白-1单克隆抗体
中图法分类号:R322.12;R329.25;R392.11 文献标识码:A

Antagonistic effect of MCP-1 McAb and Losartan on proliferation and migration of Ang-Ⅱ-mediated VSMCs *in vitro*

HE Zuo-yun, LI Ai-min (Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the possibility of monocyte chemotactic protein-1 monoclonal antibody(MCP-1 McAb) or Losartan antagonizing the proliferation and migration of cultured vascular smooth muscle cells (VSMCs) mediated by angiotensin Ⅱ(AngⅡ). Methods The cultured VSMCs were divided into 5 groups, i.e. 2% fetal calf serum group (2%FCS group), AngⅡ group (concentration of 10^{-10}—10^{-6} mol/L), Losartan group (concentration of 10^{-7}—10^{-5} mol/L), MCP-1 McAb group(final concentration of 10 μg/ml) and positive control (concentration 5% zymosan). The migration effects of cultured VSMCs were examined by a modified Boyden's chamber. And the proliferation effect was evaluated with MTT, thiazolyl blue intaking, ^{3}H-TdR and ^{3}H-proline incorporation as well as VSMCs count. Results ①AngⅡ exerted an enhancing effect on the proliferation and migration of cultured VSMCs in a concentration-dependent manner; ②Both MCP-1 McAb and Losartan could antagonize the proliferation and migration of AngⅡ-mediated VSMCs. Conclusion It is suggested that MCP-1 McAb and Losartan both play predominant roles in inhibiting the proliferation and migration of VSMCs and are prospective in the treatment of atherosclerotic diseases.

Key words: vascular smooth muscle cells; proliferation; migration; monocyte chemotactic protein-1 monoclonal antibody

近来研究表明血管紧张素Ⅱ(Angiotensin Ⅱ, AngⅡ)对血管平滑肌细胞(Vascular smooth muscle cells, VSMCs)具有生长激素样作用,在冠状动脉粥样硬化性心脏病和血管成形术后再狭窄等闭塞性血管病变的发生、发展中起着重要作用。本实验目的在于探讨AngⅡ对培养VSMCs增殖与迁移效应的影响,并探讨单核细胞趋化蛋白-1单克隆抗体(Monocyte chemotactic protein-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39600041)
作者简介:何作云(1939—),男,辽宁省大连市人,硕士,主任医师,教授,主要从事动脉硬化血栓性疾病的发病机制与防治方面的研究,发表论文96篇。电话:(023)65220165
收稿日期:2000-01-15;修回日期:2000-05-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 monoclonal antibody, MCP-1 McAb)和 Losartan 拮抗 Ang Ⅱ介导的上述生物效应, 为防治或消退动脉粥样硬化提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 VSMCs 迁移试验

采用改良的 Boyden 小室法[1] 取生长活跃的培养 VSMCs(第 2~5 代)进行实验。0.25%胰蛋白酶消化 VSMCs, 用含 2%胎牛血清(2% FCS)的 M199 培养液将细胞密度调为 1×10^6/ml, 使细胞在培养液中悬浮 1 h 以恢复形态。混匀细胞悬液, 吸取 0.35 ml 分别加入 Boyden 小室的上室内, 吸取含 2% FCS 的 M199 培养液 0.5 ml 加入 Boyden 小室的下室内, 此为 2% FCS 组; 下室内分别加入 10^{-10} ~ 10^{-6} mol/L 浓度的 Ang Ⅱ、10^{-7} ~ 10^{-5} mol/L 的 Losartan、5%的酵母多糖活化血清及在上室中加入终浓度为 10 μg/ml 的 MCP-1 McAb, 则分别为 Ang Ⅱ组、Losartan 组、阳性对照组及 MCP-1 McAb 组, 并在 Losartan 组和 MCP-1 McAb 组中分别在其下室中加入 Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L。封闭下室小孔, 置37 ℃, 5%二氧化碳孵箱内培养 6 h。取出 Boyden 小室内的微孔滤膜, PBS 洗 2 次, 无水乙醇固定 10 s 以杀死细胞, PBS 洗 2 次后以 Harris 苏木素染色 5 min, 蒸馏水冲洗, 1%盐酸酒精脱色 3 min, 流水冲洗, 1% $NaHCO_3$ 显蓝染色 3 min。水洗后, 37 ℃烤膜过夜, 无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 将滤膜上载玻片以中性树胶封片, 在显微镜下, 计算滤膜下 10 μm 处随机计数膜内不同层次的 VSMCs 数, 每张膜观察 10 个高倍视野(10 HF), 计算其总数。双份滤膜内的移动细胞平均数表示 VSMCs 的迁移效应程度。

1.2 VSMCs 增殖效应检测

1.2.1 细胞生长曲线检测 以 MTT 法检测[2] 2% FCS、F-12HAM培养液对照组、Ang Ⅱ组、Losartan 组和 MCP-1 McAb 组。

1.2.2 VSMCs 内 DNA 和蛋白质合成的检测 以 ^{3}H-TdR 掺入法[3] 和 ^{3}H-脯氨酸标记法[4] 检测上述 4 组的 DNA 和蛋白质合成量。

1.2.3 VSMCs 计数 将细胞密度调整为 4×10^4/ml, 以每孔 1 ml加入 24 孔培养板孔中, 分别加入 2% FCS(2% FCS 组)、2% FCS+ 10^{-7} mol/L Ang Ⅱ(Ang Ⅱ组)、Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L+10^{-5} mol/L Losartan+ 2% FCS(Losartan 组)和 10^{-7} mol/L Ang Ⅱ + 10 μg/ml MCP-1 McAb(MCP-1 McAb 组)常规培养 96 h 后收集细胞, 用血球计数板计数各孔 VSMCs 数量。每组试验重复 5 次, 取其均值。

1.3 统计学处理

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用单因素方差分析比较组间差异的显著性。

2 结果

2.1 VSMCs 迁移试验结果

2% FCS 有少量的 VSMCs 移动, 提示其含有生理量的 VSMCs 的趋化物质或生长因子; 在 Ang Ⅱ组中, VSMCs 的迁移数量随着 Ang Ⅱ浓度由 10^{-10} 至 10^{-6} mol/L 的递增而明显的增加($P<0.01$), 见图 1; Losartan 或 MCP-1 McAb 均能显著地抑制 Ang Ⅱ介导的 VSMCs 的迁移效应($P<0.01$), 见图 2。

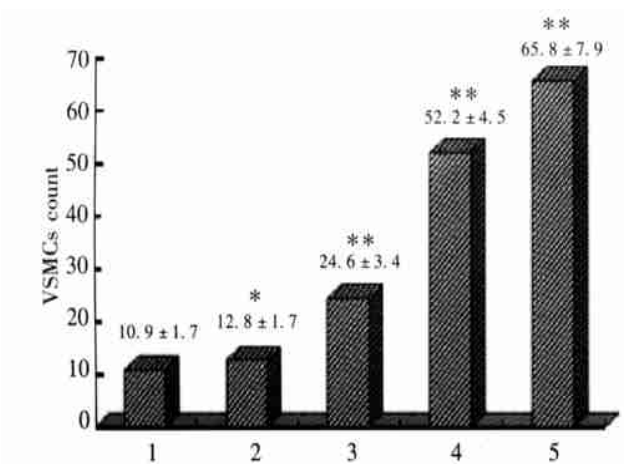


图 1 Ang Ⅱ和 2% FCS 对 VSCMs 迁移的影响

Fig 1 Effect of Ang Ⅱ and 2% FCS on VSCMs migration

1: Control(2% FCS); 2, 3, 4, 5: 10^{-10}, 10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6} mol/L Ang Ⅱ + 2% FCS; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

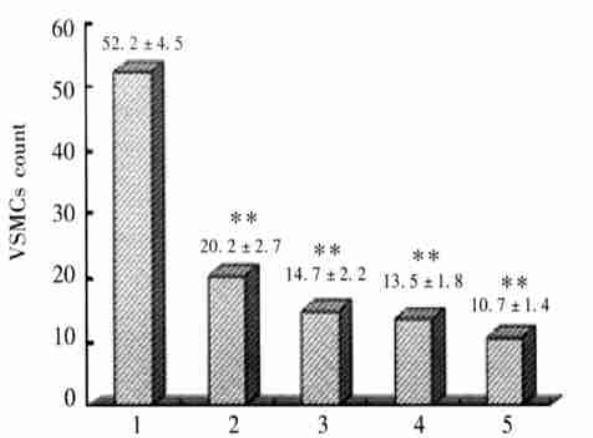


图 2 Losartan 和 MCP-1 McAb 对 VSMCs 迁移的影响

Fig 2 Effect of Losartan and MCP-1 McAb on VSCMs migration

1: Control (Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L); 2, 4, 5: Losartan 10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5} mol/L + Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L; 3: MCP-1 McAb + Ang Ⅱ 10^{-7} mol/L; **: $P<0.01$ *vs* control

2.2 VSMCs 增殖试验结果

2.2.1 Ang Ⅱ促进 VSMCs 的细胞代谢、DNA 和蛋白质合成

Ang Ⅱ在 10^{-10} ~ 10^{-6} mol/L 范围内, 呈其浓度或剂量依赖性的增加 VSMCs 内细胞代谢、DNA 和蛋白质合成量, 然而 Ang Ⅱ 10^{-12} mol/L 却无上述效应, 见表 1。

2.2.2 Losartan 和 MCP-1 McAb 抑制 VSMCs 内细胞代谢、DNA

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

和蛋白质合成　Losartan 在 10^{-7} ~ 10^{-5} mol/L 范围内, 呈剂量依赖性抑制 VSMCs 内细胞代谢、DNA 和蛋白质合成量, 见表 1。MCP-1 McAb 也能明显抑制 VSMCs 内细胞代谢(对 MTT 的摄取与代谢, D_λ 值降至 0.060±0.008, $P<0.01$)、DNA[^{3}H-TdR 掺入量降至(2 121.4±122.2) min^{-1}, $P<0.01$] 和蛋白合成量[^{3}H-脯氨酸掺入量降至(1 206.0±177.0) min^{-1}, $P<0.01$]。

表 1　AngⅡ促进 VSMCs 的细胞代谢、DNA 和蛋白质合成量

Tab 1　Cellular metabolic level and synthesis of DNA and protein increased by AngⅡ

	2%FCS	AngⅡ (C_B /mol·L^{-1})				Losartan (C_B /mol·L^{-1})		
		10^{-10}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}
MTT(D_λ)	0.045±0.014	0.080±0.015 **	0.134±0.021 **	0.170±0.043 **	0.213±0.045 **	0.101±0.009 *	0.080±0.005 **	0.043±0.004 **
^{3}H-TdR(A/Bq)	142.7±3.3	154.7±5.8 *	173.3±10.2 **	278.4±10.6 **	309.5±8.0 **	170.6±5.9 *	158.0±6.5 **	145.5±6.1 **
^{3}H-proline incorporation(A/Bq)	69.2±13.9	85.7±14.2 *	104.1±16.0 **	186.6±20.5 **	214.5±24.5 **	135.8±16.9 *	95.5±15.4 **	73.7±14.8 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* 2% FCS

2.2.3　VSMCs 计数　AngⅡ 10^{-7} mol/L 虽然对 VSMCs 的增殖效应有促进作用, 但其计数无明显改变($P>0.05$), 而且 Losartan 或 MCP-1 McAb 对 VSMCs 计数也无明显影响($P>0.05$)。推测 AngⅡ 10^{-7} mol/L 在常规培养 96 h 仅使 VSMCs 进入细胞周期的 G_1 期、S 期和 G_2 期, 尚未完成 M 期, 故 VSMCs 计数无明显变化, 见表 2。

表 2　各组对 VSMCs 计数的影响

Tab 2　Effects of 2% FCS, AngⅡ and Losartan and MCP-1 McAb on VSMCs count

Group	VSMCs count(1×10^4/ml)	P value
2%FCS	3.97±0.90	
2%FCS+AngⅡ	4.24±0.92	>0.05
2%FCS+AngⅡ+Losartan	3.99±0.80	>0.05
2%FCS+AngⅡ+MCP-1 McAb	3.96±0.90	>0.05

3　讨论

肾素-血管紧张素系统(RAS)是主要的体液调节系统, 对血管和机体内环境的稳定起重要作用。血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)是该系统的重要生物活性肽, 它的生理作用主要由AngⅡ受体(AT_1)所介导, 对 VSMCs 的短期作用表现为血管收缩; 长期作用系促进 VSMCs 增殖和肥厚, 诱导原癌基因(c-myc, c-fos)表达及自分泌生长因子(血小板衍化生长因子 PDGF-A, 碱性成纤维生长因子 bFGF, 转化生长因子 TGF-β_1), 可能与血管重塑(Remodeling)有关[5,6]。

我们的实验结果表明: 在 AngⅡ 10^{-10} ~ 10^{-6} mol/L 浓度或剂量范围内, 均能促进 VSMCs 迁移, 而且迁移效应的强度随着 AngⅡ浓度的增大而增强, 从而提示 AngⅡ的浓度或剂量是导致 VSMCs 由中层迁移至内膜下, 并吞噬脂质形成 VSMCs 源性泡沫细胞的主要因素。VSMCs 迁移的主要趋化物质系 MCP-1[7], 其生理作用系通过 AT_1 发挥作用的[5]。因此, 当采用 MCP-1 McAb 终浓度 10 μg/ml 或 AT_1 拮抗剂 Losartan 10^{-7} ~ 10^{-5} mol/L 拮抗时, 则明显地抑制 VSMCs 迁移效应, 从而为防治或消退动脉粥样硬化提供了一定的理论依据。

本实验培养的 VSMCs 经倒置显微镜形态学和特异性抗平滑肌细胞 α-actin 单克隆抗体行免疫组化染色鉴定, 取培养的第 2 ~ 5 代 VSMCs, 一部份观察 VSMCs迁移试验; 另一部分观察 VSMCs 增殖试验。结果表明, 在 AngⅡ 10^{-10} ~ 10^{-6} mol/L 浓度或剂量范围内, 呈剂量依赖性的增加 VSMCs 内细胞代谢和生长、DNA 和蛋白质合成量, 然而 AngⅡ 10^{-12} mol/L 却无上述生物效应。因此低浓度或生理剂量的 AngⅡ对维持血管张力是必需的。然而, 过多分泌的 AngⅡ可使血管收缩, 肾脏水钠潴留增加, 心脏前后负荷增加; AngⅡ诱导 VSMCs 自分泌 MCP-1, 它又作用 MCP-1 受体 CCR_2[8], 从而促进 VSMCs 的增殖与迁移[7]。

我们的实验结果表明, 当采用 MCP-1 McAb 或 Losartan 均能拮抗 AngⅡ介导的 VSMCs 的增殖与迁移, 提示 MCP-1 McAb 或 Losartan 在防治动脉硬化性疾病中起着重要的作用。

参考文献:

[1] 张成武, 邹伟文. 人白细胞趋化性滤膜测定法及其影响因素[J]. 中国免疫学杂志, 1987, 3(4): 365—367.

[2] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. J Immunol Methods, 1983, 65(1): 55—63.

[3] 王向宇, 吴可贵, 晋学庆, 等. 血管紧张素Ⅱ对不同培养条件下自发性大鼠血管平滑肌细胞的影响[J]. 高血压杂志, 1996, 4(3): 245—247.

[4] Jimi S, Saku K, Vesugi N, *et al*. Oxidized low density lipoprotein stimulates collagen production in cultured arterial smooth muscle cells[J]. Atherosclerosis, 1995, 116(1): 15—26.

[5] Gibbons G H, Dzau V J. The emerging concept of vascular remodeling[J]. New Engl J Med, 1994, 330(4): 1 431—1 436.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[6] 王关嵩, 钱桂生, 黄桂君, 等. 外源性 CO 对大鼠肺动脉平滑肌细胞迁移的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2000, 16(2): 169－171.

[7] 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.

[8] Hayes Z M, Jordan N J, Towers S, *et al*. Human vascular smooth muscle cells express receptors for CC chemokines[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998, 18(4): 397－403.

(编辑 冷怀明)

经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2000)09-0818-01

后颅凹减压术治疗原发性脑干损伤 12 例

Decompression of cerebellar fossa in the treatment of 12 cases of primary brain stem injury

蒋聚洪 (浙江省瑞安市人民医院神经外科, 瑞安 325200)

原发性脑干损伤病情危重, 病死率和病残率都很高, 是脑外伤治疗中的棘手问题。我院自 1998 年 1 月至 1999 年 8 月采用后颅凹减压术治疗原发性脑干损伤 12 例, 疗效满意, 现报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

本组共 12 例, 男 8 例, 女 4 例。年龄 14～56 岁, 平均 32 岁。车祸伤 7 例, 坠落伤 3 例, 打砸伤 2 例。入院 GCS 评分 3～5 分 8 例, 6～8 分 4 例, 临床表现为去大脑强直 4 例, 瞳孔变化 4 例, 锥体束征 3 例, 高热 2 例, 呼吸紊乱 2 例, 低血压 1 例, 损伤在间脑-中脑平面 3 例, 中脑平面 4 例, 脑桥平面 3 例, 延髓平面 2 例。12 例病人均经 CT 或 MRI 检查显示有脑干点片状出血, 脑干增粗, 基底池、环池、四叠体池变窄或消失, 其中 6 例合并大脑半球脑挫裂伤, 4 例有小脑挫伤, 2 例合并脑内小血肿, 1 例有薄层硬膜下血肿, 均未行血肿清除。

1.2 手术方式和术后治疗

12 例全部为急诊手术, 手术采用枕下正中入路, 显露双侧枕鳞, 开大骨窗, 下界咬开枕骨大孔充分减压, 剪开硬膜, 打开枕大池放脑脊液, 并行双侧小脑幕切开, 如有小脑膨出, 则切除小脑半球外侧 1/3, 脑膜不缝合。如有脑积水, 先作脑室引流。术后均早期行气管切开, 同时进行抗脑水肿、抗感染和支持等治疗。

1.3 结果

3 例死亡, 1 例植物生存状态, 1 例重残, 2 例轻残, 5 例生存良好。死亡原因均为脑干功能衰竭。

作者简介: 蒋聚洪(1966－), 男, 浙江省瑞安市人, 主治医师, 主要从事脑外伤方面的研究。电话: (0577)5685871

收稿日期: 2000-01-25; 修回日期: 2000-07-21

2 讨论

原发性脑干损伤通常采用保守治疗, 但治疗效果并不满意[1]。本组病人采用后颅凹减压手术治疗, 取得较为满意的效果, 12 例病人中仅死亡 3 例, 5 例生存良好。回顾本组病人的手术治疗过程, 我们体会如下。

病例及手术时机的选择: 病例应选择脑干及其周围脑池压力增高明显的病人, 在 CT 上表现为脑干增粗, 环池、基底池和四叠体池明显缩小或消失, 如合并有脑干周围组织的挫伤如小脑挫伤更是手术的适应征, 本组中有 4 例小脑挫伤均疗效满意。脑干损伤平面越高手术疗效越好, 在延髓损伤合并有呼吸循环紊乱时手术疗效欠佳, 本组中 2 例损伤平面在延髓者均预后不良, 1 例死亡, 1 例重残。手术时机的选择应在伤后早期, 我们的病例多在伤后 24 h 进行, 即在脑水肿高峰期到来之前, 能较好地预防脑干的继发性损伤。

后颅凹减压术的作用: 脑干的挫裂伤引起水肿, 周围脑池的压力增高, 使脑干本身所受的压力增高, 又会加重脑干的缺血水肿, 导致水肿－压力增高－缺血恶性循环[2]; 原发性脑干损伤多合并有脑挫裂伤或弥漫性轴索损伤以及颅内血肿, 从而压迫脑干引起继发性损伤, 后颅凹充分减压可以减轻脑干所受压力, 终止上述的恶性循环, 避免脑干的继发性损伤, 有助于病人的预后。同时我们在后颅凹减压时切开了小脑幕, 咬开枕大孔, 能预防小脑幕切迹疝和枕大孔疝的发生, 对防止脑干的继发性损伤有较好作用。

关键词: 脑干损伤; 后颅凹减压术; 颅脑外伤
中图法分类号: R651.1 文献标识码: B

参考文献:

[1] 刘敬业, 马景鉴, 薛庆澄. 原发性脑干损伤[J]. 中国神经精神疾病杂志, 1986, 12(3): 354－356.

[2] 赵卫忠, 张系科, 李天都, 等. 颅脑外伤后脑干周围池的改变与预后[J]. 中华创伤杂志, 1998, 14(2): 107－108.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net