

剪切力对单核细胞趋化蛋白-1的影响*

于红梅¹⁾ 曾衍钧^{1)**} 胡金麟²⁾ 李彩霞¹⁾

(¹⁾北京工业大学生物医学工程中心, 北京 100022; ²⁾中国人民解放军总医院微循环研究室, 北京 100853)

摘要 单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 能趋化单核细胞在内皮细胞下聚集, 是动脉粥样硬化最早期的病理改变之一。从生物力学的角度对体外培养的人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 合成和分泌 MCP-1 的规律作了研究。通过流动小室, HUVEC 给予 0.4, 1.0, 2.0 N/m² 的剪应力, 运用免疫组化, 图象处理及 ELISA 方法测出不同时间胞浆及灌流液中 MCP-1 的含量, 结果表明 HUVEC 合成和分泌 MCP-1 是随剪切力和时间变化而变化的。该工作为进一步理解剪切力诱导动脉粥样硬化的发生提供实验数据。

关键词 剪切力, 脐静脉内皮细胞 (HUVEC), 单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1), 动脉粥样硬化

学科分类号 Q256

动脉粥样硬化是综合性的较长的病理过程, 其发病机制有多种学说, 一般认为动脉壁内皮损伤是动脉粥样硬化的始动因素。

内皮细胞处在血流环境中, 血流及其产生的机械力对内皮细胞可产生多方面的效应。适当应力对于维持内皮正常生理功能必不可少。但如果血流变化超过阈值, 内皮细胞会发生病变。动脉粥样硬化常发生于大血管分支或弯曲处。该处血液为湍流, 管壁承受切应力低, 这些差异及所造成内皮细胞流学性质的改变可能是动脉粥样硬化的重要病因^[1]。

动脉粥样硬化早期单核细胞在内皮细胞下聚集。在此起到重要作用的是 MCP-1^[2]。MCP-1 是一种单核细胞特异性趋化因子, 可产生于多种细胞, 在动脉粥样硬化的早期, 主要产生于内皮细胞。正常动脉中极少细胞表达 MCP-1。现已发现许多化学因子可影响 MCP-1 的基因表达和蛋白质分泌, 如 IL-1^[3], TNF- α , PDGF 等。Shyy 等^[4]于 1994 年提出 MCP-1mRNA 的表达受剪应力双相调控。

实验中观察了不同剪应力下 MCP-1 的合成分泌规律。发现剪应力 0.4 N/m² 作用 2 h 后 MCP-1 合成和分泌开始增加, 5 h 后达高峰, 6 h 后 MCP-1 重新回到静息水平, 即使持续给予剪切力, 其分泌量不会增加。而 1.0 N/m² 剪应力下 MCP-1 分泌量变化小。该工作为研究剪切力对 EC 的影响提供了实验方法和数据。

1 材料和方法

M-199 培养基, HEPES, 胰蛋白酶, 谷氨酰胺, 1% 明胶 (均为美国, Gibco 公司), 新生牛血清 (杭州四季青公司), 0.01% 单核细胞生长因子

添加剂 (ECGS) (美国, Sigma 公司), 青霉素钠, 硫酸链霉素 (100 万单位, 华北股份有限公司)

1.1 人脐静脉内皮细胞培养

无菌条件下, 取长约 20 cm 新生儿脐带, 于 4 h 之内清理脐带, 向脐静脉内注入 15 ml 0.25% 的胰蛋白酶, 37.5 °C 温浴。20 min 后, 终止消化, 收集, 离心消化液。弃上清液, 加入培养液, 吹打均匀。以 1.0×10^5 /ml 的细胞密度接种于明胶覆盖的 60 mm 玻璃培养皿中。放入 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱 (TE-HER, 日本) 培养。6~10 h 后更换培养液。其后每周换液 3 次。待细胞铺满 2/3 培养皿时将细胞传代在细胞载片上培养。换液如前, 3~5 d 后用于实验。

内皮细胞鉴定: 相差倒置显微镜下细胞成铺路石样形态; VIII 因子相关抗原检测阳性, 镜下见胞内有棕黄色颗粒。

1.2 流动装置及流动参数的计算

流动装置结构见图 1。上下两层为有机玻璃。下层中部是 2 cm $\times$ 1 cm $\times$ 0.02 cm 的长方形槽, 放置细胞载片。其外槽 6 cm $\times$ 1.35 cm $\times$ 0.04 cm, 与上层有机玻璃共同形成灌流腔, 腔两端各有通道用于注入和流出灌流液。上下两层以医用乳胶垫片密封。对于平行板流动槽, 形成的剪应力 τ 为:

$$\tau = 6\eta Q / wh^2$$

η 为液体粘度 (N/m²), Q 为流量 (ml/min), w 为流室宽度, h 为流室高度。实验中 $\eta = 0.99$ mPa.s, $w = 1.35$ cm, $h = 0.04$ cm, 因此: $\tau = 0.458 Q$

* 北京市自然科学基金资助项目 (3982005)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-67392172, E-mail: yjzeng@bjpu.edu.cn

收稿日期: 2001-01-31, 接受日期: 2001-04-05

灌流液由恒流泵泵出, 经管道流入流动小室, 剪切细胞后回到储液瓶. 系统置于 37°C , $5\% \text{ CO}_2$ 细胞培养箱. 灌流液为含 $10\% \text{ FBS}$ 的培养液, 保持总量为 8 ml .

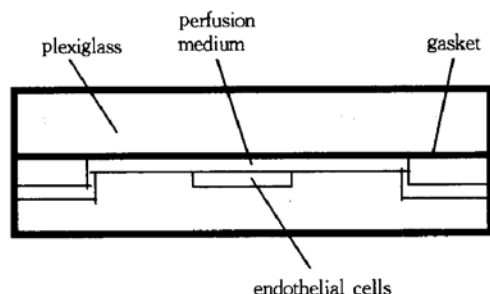


Fig 1 Scheme of the parallel plate laminar flow chamber

1.3 内皮细胞 MCP-1 免疫组化染色

MCP-1 染色用北京中山公司 MCP-1 免疫组化染色试剂盒. 其具体方法见试剂盒说明书. 用 Image Pro-Plus (Media Cybernetics 公司, 美国) 图象分析软件分析 HUVEC 胞浆的平均灰度值.

1.4 灌流液中 MCP-1 的测定

循环开始后在设定每时间点收集流出液以及静态培养液各 1 ml , 同时补充 1 ml 新鲜培养液. 样本中的 MCP-1 含量测定按照 MCP-1 ELISA 试剂盒 (法国国际免疫公司) 方法, 标准品与样品的吸光

度值用 450 nm 酶标仪中测出, 制定标准曲线. SPSS 进行统计和 t 检验 ($P < 0.05$).

2 结 果

2.1 内皮细胞鉴定

培养细胞的 VIII 因子相关抗原染色阳性, 胞浆可见棕黄着色 (图 2).

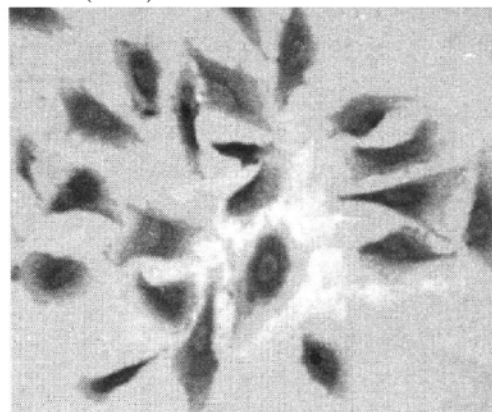


Fig 2 Identification of endothelial cells

The cytoplasm was stained brown yellow, indicated positive factor VIII antigen

2.2 免疫组化染色结果

静态培养的对照组 HUVEC 胞浆中基本无棕黄着色, 与本底色接近 (图 3a). 剪应力 0.4 N/m^2

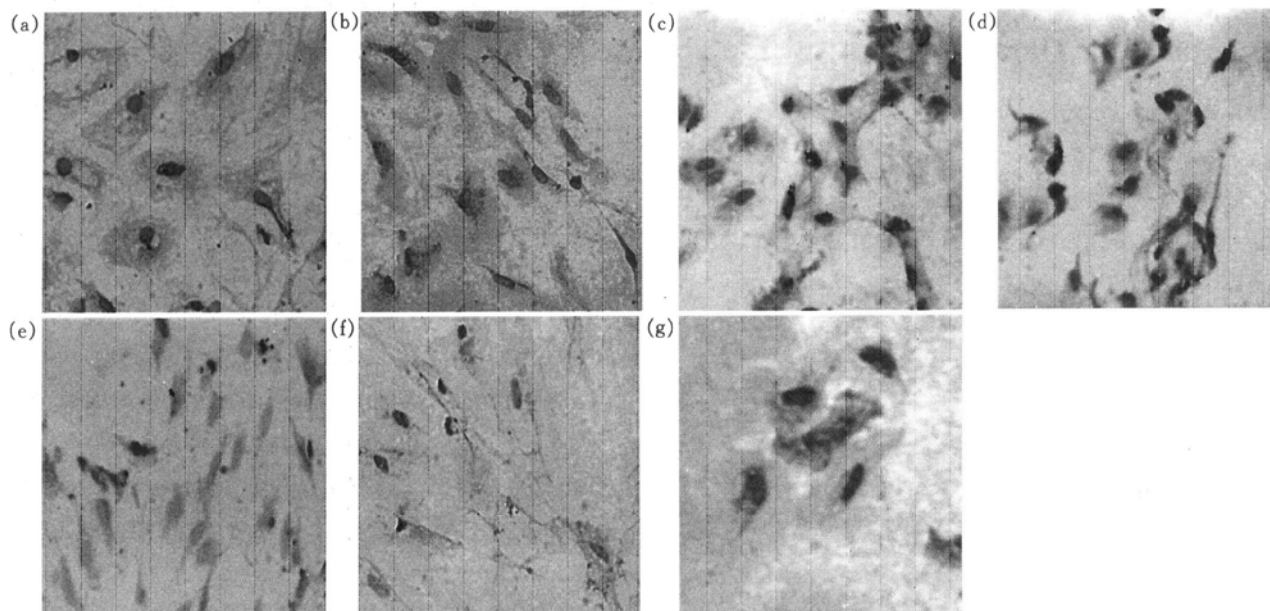


Fig 3 Gray variation schematic diagram of MCP-1 of endothelial cells under action of shear stress

(a) The controlled group was not stained brown yellow after being applied with ABC staining; (b) HUVECs were immunohistochemistry stained after exposed to shear stress of 0.4 N/m^2 for 0.5 h . The cytoplasm was stained light yellow, which indicated the synthesis of MCP-1 was few; (c) The cytoplasm was stained more brown yellow after HUVECs had been exposed to shear stress of 0.4 N/m^2 for 2 h . This indicated that MCP-1 protein was increased in HUVECs cytoplasm; (d) The cytoplasm was stained brown yellow after HUVECs had been exposed to shear stress of 0.4 N/m^2 for 4 h . MCP-1 protein was synthesized significantly in the cytoplasm; (e) Immunohistochemistry stain after HUVECs were exposed to shear stress of 0.4 N/m^2 for 6 h . The cytoplasm was stained lightly, the synthesis of MCP-1 protein was decreased; (f) Immunohistochemistry stain after HUVECs were exposed to shear stress of 1.0 N/m^2 for 0.5 h . The cytoplasm was stained lightly, the synthesis of MCP-1 protein was few; (g) The cytoplasm was stained brown yellow after HUVECs had been exposed to shear stress of 4 h shear stress of 0.4 N/m^2 . MCP-1 protein was synthesized significantly in the cytoplasm.

作用 0.5 h, 2 h, 4 h, 6 h 后染色结果如图 3 (b, c, d, e) 可见 2 h 和 4 h 染色加深, 6 h 后变浅. 剪应力 1.0 N/m^2 作用 0.5 h, 4 h 后染色结果如图 3f 和图 3g. 0.5 h 时胞浆着色浅, 4 h 时胞浆着色加深.

2.3 图象分析

图象分析结果显示: 对照组内皮细胞胞浆内基本不着色, 灰度值较高, 合成较少, 剪切力作用后, 内皮细胞灰度值随时间的延长有双相变化, 在 2 h, 5 h 时, 灰度值较低, 在 0.5 h, 6 h 时灰度值较高. 当时间一定时, 剪应力 0.4 N/m^2 时各灰度值较 1.0 N/m^2 时低 (图 4).

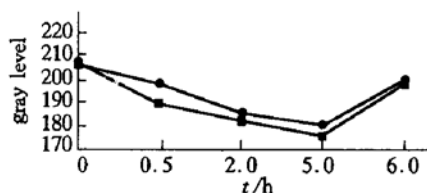


Fig. 4 The gray level of HUVECs under different magnitude of shear stress

●—●: 1.0 N/m^2 ; ■—■: 0.4 N/m^2 .

2.4 ELISA 实验结果分析

根据标准曲线求出曲线方程, 得到各时间点 MCP-1 的分泌量. 当剪切力一定时, 即剪应力为 0.4 N/m^2 时, 得到 MCP-1 的分泌变化曲线, 显示 MCP-1 蛋白的合成及分泌呈累积性增加, 在 2 h 后明显上升, 5 h 左右达到高峰, 之后以较快速度下降, 6 h 后降至低点, 并保持在低水平, 不再上升 (图 5). 当时间一定时, 剪应力为 0.4 N/m^2 时各时间点的浓度值较剪应力 1.0 N/m^2 时高 (图 6).

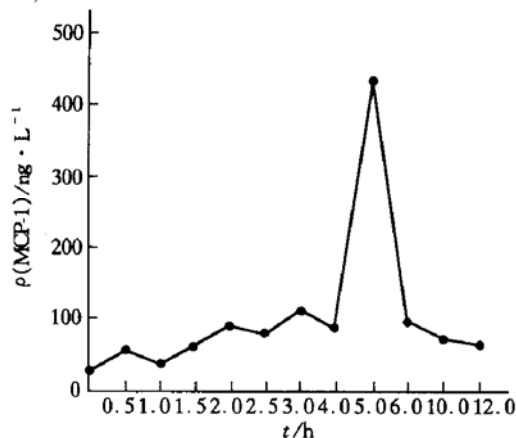


Fig. 5 The secretion of MCP-1 under shear stress of 0.4 N/m^2

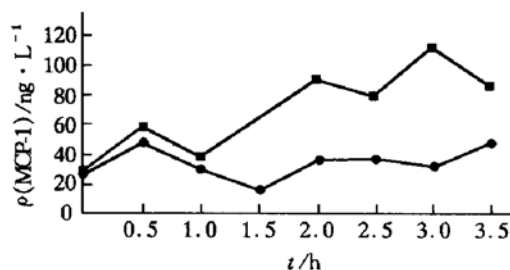


Fig. 6 The secretion of MCP-1 under different level of shear stress

●—●: 1.0 N/m^2 ; ■—■: 0.4 N/m^2 .

3 讨 论

动脉粥样硬化的发病机理非常复杂, 现已有多种学说, 其中损伤应答学说认为动脉粥样硬化病变始于内皮损伤, 而物理因素如血流动力学的致损伤作用近 20 年来已成为热点. 剪切力对内皮细胞的结构功能的调控可以发生在多个环节.

本实验中主要研究剪切力对 MCP-1 合成与分泌的影响. 低剪应力是动脉粥样硬化高发区的主要特征, 我们观测 0.4 N/m^2 时 MCP-1 蛋白的分泌. 结果证明低剪应力作用时, MCP-1 蛋白的分泌对时间有依赖性. 而 Shyy 等^[4]证明剪应力对 MCP-1 mRNA 表达有双向作用, 峰值时间出现在剪应力作用 1.5 h 时. 可以推测对 MCP-1 mRNA 表达的调控仅是剪应力作用的一个环节. 最终分泌出发挥生物学效应的 MCP-1 在时间与浓度上均有所变化. 这表明在起始环节与最终的生物效应之间, 仍然有其他因子的参与. 在力学信号的传导机制上, 涉及到复杂的力学感受器和信号传导网络^[5]. 在基因转录水平, 剪切力可以启动 EC 原癌基因 *c-jun*, *c-fos*^[6]的表达, 抑制细胞凋亡基因的表达^[7], 以 mRNA 的表达变化调控细胞. 另外, PDGF, bFGF 等几种因子的基因表达也受到剪切力的双相调节, 细胞因子之间相互影响, 同样影响 MCP-1 的分泌. 最后, 参与蛋白质分泌的因子同样会受到剪切力的影响. 因此推论剪切力对 MCP-1 的调控是多种因素共同作用的结果.

剪切力作用 6 h 后, 灌流液中 MCP-1 水平接近对照组, 并且在持续的剪切力作用下没有再次增加. 原因可能是在稳定的血流切应力环境中, MCP-1 基因表达为静息型, 因而 MCP-1 合成少. 同时, 一定时间内持续的力学刺激导致力传导的反

馈抑制如离子通道的失活, Ca^{2+} 泵逆向调节细胞内 Ca^{2+} 浓度等, 以及浓度反馈抑制和 MCP-1 本身在基质中较快的代谢速度, 均可以造成 MCP-1 浓度的下降。此外, 灌流液的成分与血浆成分差别很大, 不含单核细胞, MCP-1 的生物学效应无法发挥, 细胞之间缺乏相互影响, 进而, MCP-1 的分泌量减少。因此也可解释 MCP-1 在动脉粥样硬化发病早期主要产生于内皮细胞。

参 考 文 献

- 1 Fung Y C, Liu S Q. Elementary mechanics of the endothelium of blood vessels. *J Biomech Eng*, 1993, **115** (1): 1~ 12
- 2 Nelken N A, Coughlin S R, Gordon D, *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 1991, **88** (4): 1121~ 1127
- 3 Brach M A, Gruss H J, Riedel D, *et al.* Effect of antiinflammatory agents on synthesis of MCP-1/JE transcripts by human blood monocytes. *Mol Pharmacol*, 1992, **42** (1): 63~ 68
- 4 Shyy Y J, Hsieh H J, Shunichi U, *et al.* Fluid stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein-1 gene expression in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (11): 4678~ 4682
- 5 Resnick N, Yahav H, Schubert S, *et al.* Signalling pathways in vascular endothelium activated by shear stress: relevance to atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 2000, **11** (2): 167~ 177
- 6 Ranjan V, Dimmeler S L, *et al.* Fluid shear stress induces synthesis and nuclear localization of c-fos in cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **196** (1): 79~ 84
- 7 Dimmeler S, Haedeler J, Rippmann, *et al.* Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett*, 1996, **399** (1-2): 71~ 74

Fluid Shear Stress Regulates the Synthesis and Secretion of Monocyte Chemotactic Protein-1*

YU Hong-Mei¹⁾, ZENG Yan-Jun^{1)**}, HU Jin-Lin²⁾, LI Cai-Xia¹⁾

¹⁾ Biomedical Engineering Center, Beijing Polytechnic University, Beijing 100022, China;

²⁾ Laboratory of Microcirculation, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

Abstract Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) is a potent special chemoattractant capable of recruiting monocytes into the subendothelium. In order to study the patterns of fluid shear stress on induction of MCP-1 secretion in cultured human umbilic vein endothelial cells (HUVEC), the relationship of fluid shear stress and the secretion of MCP-1 was examd, cultured HUVEC were subjected to controlled levels of shear stress (0.4, 1.0, 2.0 N/m²) in a parallel plate flow chamber. MCP-1 in HUVEC of different periods was measured by immunohistochemistry method and image analysis; MCP-1 in perfusion is measured by ELISA. The results of the experiment demonstrated the secretion of MCP-1 regulated by shear stress was time- and force-dependent. The accumulated level of MCP-1 in HUVEC under lower shear stress (0.4 N/m²) for 4~ 5 h was 3-fold compared with that for static cells. When the shear stress lasted to 6 h, the secretion of MCP-1 was reduced to normal levels and could not be increased. Such research provides data for understanding the mechanism of the contribution of hemodynamic forces to atherosclerosis.

Key words fluid shear stress, human umbilic vein endothelial cells (HUVEC), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), atherosclerosis

* This work was supported by a grant from Beijing Natural Scientific Foundation (3982005).

** Corresponding author. Tel: 86-10-67392172, E-mail: yjzeng@bjpu.edu.cn

Received: January 31, 2001 Accepted: April 3, 2001