

大蒜精油抑制白细胞介素-1 α 诱导的单核细胞-内皮细胞粘附及机理探讨

葛璐璐 张 薇 戴 云 臧 燕 黄纯洁

内容提要 目的:观察大蒜精油(EGO)对白细胞介素-1 α (IL-1 α)诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)上血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)表达及单核细胞粘附率的影响。方法:胰酶消化法分离 HUVEC,用 U937 单核细胞与之联合培养,分别加入 IL-1 α 和 EGO 加 IL-1 α 孵育,计算单核细胞-内皮细胞粘附率,VCAM-1 免疫荧光染色,粘附细胞仪(ACAS 570)测定平均荧光值。结果:单独培养及联合培养的情况下,EGO 均对 IL-1 α 诱导的 HUVEC 上 VCAM-1 表达具有明显的抑制作用,并能显著下调 IL-1 α 作用下单核细胞-内皮细胞的粘附。结论:EGO 具有抗单核细胞与血管内皮细胞粘附的作用,其机理可能是通过抑制内皮细胞表面粘附分子的表达。

关键词 大蒜精油 内皮细胞 血管细胞粘附分子-1 白细胞介素-1 α 单核细胞 粘附

Study on Effect and Mechanism of Essential Garlic Oil in Inhibiting Monocyte-Vascular Endothelial Cell Adhesion Induced by Interleukin-1 α Ge Lulu, Zhang Wei, Dai Yun, et al *The First Military Medical University, Guangzhou (510515)*

Objective: To observe the effects of essential garlic oil (EGO) on vascular cell adhesive molecule-1 (VCAM-1) expression of endothelial cell and monocyte adhesion induced by interleukin-1 α (IL-1 α). **Methods:** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were isolated by pancreatin digestion method and co-cultured with U937 monocyte and IL-1 α or EGO + IL-1 α respectively. The adhesion rate of monocyte to endothelial cell was measured and mean fluorescent intensity of immuno-stained of VCAM-1 was determined by ACAS 570. **Results:** EGO showed significant inhibition on VCAM-1 expression induced by IL-1 α either in simple culture with HUVEC or in co-culture with HUVEC + U937, and could obviously down regulate the monocyte-endothelial cell adhesion under effect of IL-1 α . **Conclusion:** EGO has the effect of antagonizing against adhesion of monocyte and vascular endothelial cell, it may be due to the inhibition of EGO on adhesive molecular expression on endothelial cell.

Key words essential garlic oil, endothelial cell, vascular cell adhesion molecule-1, interleukin-1 α , monocyte, adhesion

几百年来,大蒜一直是用以治疗多种疾病的一种有效药物。近年来,因发现其对心血管疾病危险因素具有有益的影响而受到广泛关注。血管细胞粘附分子-1(VCAM-1, vascular cell adhesive molecule-1, VCAM-1)是免疫球蛋白超家族的成员之一,在炎症反应、细胞因子(IL-1、TNF- α)和内毒素诱导的血管内皮细胞上表达^[1],能特异地介导单核细胞、T 淋巴细胞与内皮细胞的粘附,被认为是动脉粥样硬化斑块形成的重要参与者^[2],可能对动脉粥样硬化(AS)早期形成过程中炎症细胞进入斑块具有重要意义。本研究拟探讨大蒜精油对内皮细胞 VCAM-1 表达和单核细胞-内皮细胞粘

附的影响。

材料与方法

1 主要仪器 二氧化碳培养箱(西德 Heraeus B5060 EK/CO₂),倒置显微镜(日本 Nikon DIAPHOT),粘附细胞仪(ACAS 570,美国 Meridian 公司)。

2 主要药物与试剂 RPMI-1640 培养粉(美国 GIBCO 公司),胎牛血清(FCS,杭州四季青公司),内皮细胞生长因子(EGS,美国 Sigma 公司),抗人 V β 因子单克隆抗体(美国 Maxim 公司),抗人 VCAM-1 单克隆抗体(法国 Immunotech 公司),羊抗鼠 DTAF 荧光抗体(法国 Immunotech 公司),白细胞介素-1 α (IL-

1 α , 美国 Sigma 公司), 大蒜精油(EGO, 由中国科学院植物研究所植物资源研究室提供)。

3 实验方法

3.1 细胞分离与培养 (1)单核细胞:选用 U937 人单核细胞株。(2)人脐静脉内皮细胞(HUVEC)培养:选取 5 例新鲜人脐带(脐带取自健康足月分娩产妇, 由广州南方医院妇产科提供, 长 10~15cm), 结扎脐静脉, 用 D-Hank's 液冲净血管腔, 注入 0.2% 胰蛋白酶、0.016% EDTA, 37℃ 水浴 6~8min, 收集入离心管, 并用等量含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养液终止消化, 1000r/min 离心 10min 收集细胞;用含 15% FCS 的 RPMI 1640 培养液制成细胞悬液接种于 25ml 培养瓶中, 37℃、5% CO₂ 下培养, 24h 后换液, 2~3 天后细胞长满一单层, 进行传代。传代时, 弃去原培养液, 0.2% 胰蛋白酶、0.016% EDTA, 37℃ 消化 1min 后, 镜下观察见 80% 以上的细胞收缩变圆, 即弃去消化液, 以等量含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养液终止消化, 吹打, 1000r/min 离心 10min 收集细胞;用含终浓度 100 μ g/ml ECGS 的 10% FCS RPMI 1640 培养液制成细胞悬液, 调整细胞浓度为 1×10^5 /ml, 以每皿 100 μ l 接种于改良的 Petri 培养皿上, 或将细胞悬液以 1:1 分瓶培养;实验选用第 2 代或第 3 代 HUVEC。(3)实验用 HUVEC 纯度鉴定:采用 γ 因子免疫荧光染色(一抗为 1:50 抗人 γ 因子单抗, 其余步骤同下述), ACAS 570 测定平均荧光值。结果经配对 *t* 检验分析, 示 $P < 0.01$, 说明实验用 HUVEC 达到高纯度。(4)单核细胞-内皮细胞联合培养:传代的 HUVEC 培养过夜, 待细胞充分伸展变形后, 吸去原培养液, 用 37℃ D-Hank's 液轻洗 2~3 次;将 U937 细胞用含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养液吹打成细胞悬液(调整细胞浓度至 5×10^5 /ml), 以每皿 100 μ l 接种于铺满内皮细胞的 Petri 培养皿中, 37℃、5% CO₂ 培养。

3.2 单核细胞-内皮细胞粘附率(Mr 值)测定 单核细胞-内皮细胞联合培养样品孵育后, 用 37℃ PBS 洗 3 次, 倒置显微镜下观察, 每皿观察 300 个内皮细胞, 计数其表面粘附的单核细胞数。根据公式 $Mr = (Mn \div En) \times 100\%$ 计算出单核细胞-内皮细胞粘附率[注: Mn: 内皮细胞上粘附的单核细胞个数(个); En: 所观察的内皮细胞数(个); Mr: 单核细胞-内皮细胞粘附率(%)]。

3.3 免疫荧光染色和 ACAS 570 定量检测 样品经 1% 多聚甲醛-磷酸缓冲液室温固定 5min 后, 行常规免疫荧光染色, 一抗为抗人 VCAM-1 单克隆抗体(工作浓度 1:50), 室温孵育 30min;二抗为羊抗鼠

DTAF 荧光抗体(工作浓度 1:50), 室温避光孵育 30min。空白对照组以 PBS 代替一抗。样本经上述步骤标记后, 在 ACAS 570 上进行荧光强度测定。激发波长 488nm、发射波长 475nm, 每皿测定 100 个细胞以上, 根据仪器所得, 以平均荧光值(Av)为定量参数。

4 实验分组及统计学分析 HUVEC 单独培养和联合培养样品分别设对照组、IL-1 α 组、EGO 加 IL-1 α 组和空白对照组。待单独培养样品中细胞充分伸展变形或联合培养样品接种 30min 后, 按上述分组分别加入各处理因素:对照组不加任何处理;IL-1 α 组加入终浓度 5u/ml 的 IL-1 α , 作用 6h;EGO 加 IL-1 α 组加入终浓度 5u/ml 的 IL-1 α 和终浓度 1% EGO, 作用 6h;单独培养和联合培养组各设空白对照组(加入终浓度 5u/ml 的 IL-1 α , 作用 6h), 实验重复 5 次。采用配伍组方差分析(单独培养采用 LSD 检验, 联合培养采用 SNK 检验)对实验结果进行数据处理。

结 果

1 EGO 对 IL-1 α 诱导的内皮细胞 VCAM-1 表达的影响 见表 1。在单独培养和联合培养条件下, IL-1 α 均可显著促进内皮细胞 VCAM-1 的表达, IL-1 α 组的 Av 值分别较相应对照组增加 3.3 和 2.1 倍;EGO 处理则可以显著抑制 IL-1 α 诱导的内皮细胞 VCAM-1 表达, 其抑制率分别为 59% 和 31%。同时可见, 联合培养的 3 个组均分别高于单独培养的相应组, 且增幅相近。

表 1 EGO 对 IL-1 α 诱导的内皮细胞 VCAM-1 表达的影响

组别	n	Av 值($\bar{x} \pm S\bar{x}$)		Mr 值 (%, $\bar{x} \pm s$)
		单独培养	联合培养	
对照	5	225.76 $\pm$ 135.69	500.14 $\pm$ 41.58	48.75 $\pm$ 1.49
IL-1 α	5	739.92 $\pm$ 105.84 *	1034.77 $\pm$ 106.45 *	149.20 $\pm$ 20.80 *
EGO 加 IL-1 α	5	303.06 $\pm$ 146.07 Δ	702.95 $\pm$ 114.16 $\Delta\Delta$	72.25 $\pm$ 1.11 $\Delta\Delta$

注:与对照组比较, * $P < 0.01$;与 IL-1 α 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2 EGO 对 IL-1 α 诱导的单核细胞-内皮细胞粘附的影响 见表 1。结果表明, IL-1 α 增进单核细胞-内皮细胞粘附, EGO 则可显著下调 IL-1 α 作用下的单核细胞-内皮细胞粘附(Mr 值)。

讨 论

单核细胞粘附于内皮并迁移至内皮下层是 AS 早期发生的关键步骤和重要特征⁽¹⁾。研究表明, 白细胞与内皮细胞的粘附主要是通过内皮细胞膜上的粘附分子(配体)与白细胞膜上的粘附分子(受体)的相互作用, 并经粘附分子的表达、变构和调控而实现⁽³⁾。

VCAM-1 分布于血管内皮细胞和平滑肌细胞, 也

在某些非血管性细胞(如树突状细胞、平滑肌细胞、骨髓细胞等)中表达。VCAM-1 在正常内皮细胞中的表达量非常低,但在细胞因子(如 IL-1、TNF 等)或内毒素诱导下其表达量呈大幅度升高⁽⁴⁾。VCAM-1 受体为存在于各种白细胞(除中性粒细胞外)表面的 VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$, CD49d/CD29),其功能是介导单核细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞与内皮细胞的粘附。因此 VCAM-1 被认为是在单核细胞粘附及迁移过程中均起关键作用的粘附分子。本结果表明,联合培养对照组中内皮细胞 VCAM-1 表达量高出单独培养对照组约 1 倍,提示与单核细胞的粘附上调内皮细胞 VCAM-1 表达;IL-1 α 能诱导单独培养及与单核细胞联合培养状态下内皮细胞 VCAM-1 表达,且两者的增幅相近,说明 IL-1 α 的诱导作用可能与联合培养无关;IL-1 α 还可显著增进单核细胞与内皮细胞的粘附。

在 AS 发生过程中,内皮细胞粘附分子表达增加,血液中单核细胞、淋巴细胞粘附到内皮上,继而迁移进入内皮下层,单核细胞转化为巨噬细胞,后者一方面可摄取脂质转化为泡沫细胞,另一方面可向淋巴细胞提供抗原,触发局部免疫反应;同时,巨噬细胞和淋巴细胞可释放多种细胞因子,促进平滑肌细胞表型转化(由收缩型向合成型转变)和增殖,并共同形成纤维斑块⁽⁵⁾。因此,单核细胞和内皮细胞的粘附是 AS 早期发生的关键环节之一。近年来,人们为探寻抗细胞粘附和抗粘附分子表达已作了许多尝试。现已证实,NO 能抑制单核细胞-内皮细胞粘附并抑制 VCAM-1 表达⁽⁶⁾;某些脂肪酸组分(CsA)能抑制 IL-1 α 诱导的内皮细胞 VCAM-1 表达⁽⁷⁾;雌二醇能减少 IL-4 诱导的内皮细胞 VCAM-1 表达⁽⁸⁾;维生素 E 和 DHA(二十二碳六烯酸)有减少单核细胞-内皮细胞粘附的作用^(9,10)。

大蒜提取物具有降血脂、降血压、降低血浆粘稠度、抑制血小板聚集、引起血管舒张、促进纤维蛋白溶解以及抗氧化、清除自由基等多方面的作用⁽¹¹⁾。因而被认为具有抗 AS 作用。但大蒜对预防和治疗心血管疾病的全部潜能及其作用机理尚有待阐明。

EGO 是从大蒜中提取的天然精品,含大蒜新素等多种有效成分⁽¹²⁾,具有抗氧化、降血脂、抗血栓等作用。但其是否可能通过影响粘附分子的表达而发挥作用尚未见报道。本研究结果表明,无论在单独培养或联合培养的情况下,EGO 对 IL-1 α 诱导的内皮细胞 VCAM-1 表达均具有明显的抑制作用,且在两种培养情况下 VCAM-1 下调的幅度相近,提示 EGO 的作用可能与联合培养无关。而且,EGO 可显著下调 IL-1 α

作用下单核细胞-内皮细胞粘附,但其降低后的粘附率并未达到对照组水平,究其原因可能是 EGO 仅能抑制 IL-1 α 诱导的 VCAM-1 表达,而对单核细胞粘附所产生的诱导作用无影响。

参 考 文 献

1. Cybulsky MI, Fries JW, Williams AJ, et al. Gene structure, chromosomal location, and basis for alternative mRNA splicing of the human VCAM-1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:7859—7861.
2. O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques: implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* 1993;92(2): 538—539.
3. Takahashi M, Kitagawa S, Masuyama JI, et al. Human monocyte-endothelial cell interaction induces synthesis of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Circulation* 1996; 93:1185—1193.
4. 严 鸣, 龚肖崎, 张亚霏, 等. 白细胞与内皮细胞粘附分子的调节. *中国病理生理杂志* 1993; 9(2):272—275.
5. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362(29):801—809.
6. Tsao PS, Buitrago R, Chan JR, et al. Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness: Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1. *Circulation* 1996; 94(7): 1682—1689.
7. DE Caterina R, Tanaka H, Nakagawa T, et al. The direct effect of ignitable cyclosporine and its vehicle, cremophor, on endothelial vascular cell adhesion molecule-1 expression. *Transplantation* 1995;60(3):270—275.
8. Glaser CT, Watson CA, Pardi R, et al. Effect of 17beta-estradiol on cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression. *J Clin Invest* 1996; 98(1):36—42.
9. Devaraj S, Li D, Jialal I, et al. The effect of alpha tocopherol supplementation on monocyte function. *J Clin Invest* 1996;98(3):756—763.
10. De Caterina R, Libby P. Control of endothelial leukocyte adhesion molecules by fatty acids. *Lipids* 1996; 31: s57—63.
11. Jain AK, Vargas R, Gotzkowsky S. Can garlic reduce levels of serum lipids? A controlled clinical study. *A J Medicine* 1993; 94:632—635.
12. 张吟秋, 陈 钰, 龚维桂, 等. 大蒜精油预防粥样硬化的实验研究. *中成药研究* 1984; 6:23—25.

(收稿:1998-06-09 修回:1998-09-28)