

· 博士之窗 ·

缺氧再给氧对内皮细胞免疫功能的影响及
益生注射液干预效果初探^{*}蒋红梅^{1△} 李胜富¹ 李幼平¹ 张立¹ 蔡美英² 吴大蓉³

摘要 目的 探讨缺血再灌注(缺氧再给氧)对内皮细胞免疫功能的影响及益生注射液的干预效果。方法 用人脐静脉内皮细胞株 ECV304 缺氧再给氧模型模拟体内缺血再灌注对血管内皮细胞的损伤,并用益生注射液干预其缺氧再给氧过程。间接免疫荧光染色显示胞内核因子- κ B(NF- κ B),流式细胞术检测细胞表面 HLA-ABC、HLA-DR、CD86 和 CD54,并将内皮细胞与同种异体淋巴细胞混合培养(MELR),检测淋巴细胞增殖程度、IL-2 的产生及凋亡淋巴细胞百分率。结果 缺氧再给氧使 ECV304 细胞变圆、收缩、脱落,胞浆 NF- κ B 表达增高,且由胞浆阳性为主转为胞核阳性为主,细胞表面 HLA-ABC、HLA-DR、CD86 增高,CD54 无显著变化,MELR 中³H-TdR 掺入量、IL-2 生成量显著增多,凋亡淋巴细胞百分率降低。益生注射液干预后 ECV304 细胞形态基本恢复正常,NF- κ B 表达未下调,但核阳性细胞百分率降低,以核浆阳性为主,其他多项检测指标的改变得以逆转。结论 缺氧再给氧影响了 ECV304 细胞几种重要免疫相关分子的表达,益生注射液可发挥拮抗作用,使内皮细胞保持相对正常的免疫学功能。

关键词 内皮细胞 缺氧再给氧损伤 益生注射液 免疫学

Influence of Anoxia/reoxygenation on Immunofunction of Endothelial Cells and Effect of Intervention with Yisheng Injection on It JIANG Hong-mei, LI Sheng-fu, LI You-ping, et al *Lab of Transplant Engineering and Immunology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu (610041)*

Objective: To explore the influence of ischemia/reperfusion (anoxia/reoxygenation) on immunofunction of endothelial cells (ECs) and effect of intervention with Yisheng injection (YSI, a pure natural medicine) on it. **Methods:** Model of ECs induced by anoxia/reoxygenation was established to mimic ECs ischemia/reperfusion injury in vivo with human umbilical vein endothelial cell line ECV304. Then YSI was used to intervene the anoxia/reoxygenation process. Nuclear transcriptional factor- κ B (NF- κ B) was exhibited by fluorescent staining, HLA-ABC、HLA-DR、CD86 and CD54 were detected by flow cytometry. Mixed endothelial cell-lymphocyte reaction (MELR) was conducted to examine the proliferation of lymphocyte, production of IL-2 and percentage of apoptotic lymphocyte. **Results:** Anoxia/reoxygenation made the ECV304 cell became round, shrunk and abscised, with increased plasma NF- κ B, and changed from positive cytoplasm to positive nucleus. HLA-ABC, HLA-DR and CD86 on surface of cells increased but CD54 showed unchanged. MELR showed the incorporation of ³H-TdR and production of IL-2 increased significantly and the percentage of apoptotic lymphocyte decreased. After YSI intervention, the ECV304 cell shaped recovered, NF- κ B expression didn't down-regulated, but the percentage of positive cells decreased, changed to positive dominant. Besides, reversal changes were shown in other parameters. **Conclusion:** Anoxia/reoxygenation influences some important immune related molecules in ECV304 cells, YSI could antagonizing these influences to maintain the immune function of endothelial cells in a relative normal manner.

Key words endothelial cell, anoxia/regeneration injury, Yisheng injection, immunology

^{*} 国家自然科学基金资助课题(No. 39993430) 纽约中华医学基金会(CMB)资助(2001-03-01)

1. 四川大学华西医院移植工程与移植免疫实验室(成都 610041) 2. 四川大学基础医学与法医学院免疫学教研室 3. 成都药物制剂研究所

[△] 博士, 现在贵阳医学院检验系(贵阳 550004)

通讯作者 蒋红梅, Tel 0851-6908551, E-mail jhmzq@yahoo.com.cn

移植物慢性失功(graft chronic dysfunction, GCD)是 21 世纪器官移植界一大难题^[1],缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)是其病因中最重要的非抗原依赖性因素之一。移植物血管内皮细胞(endothelial cell, EC)是 IRI 最先作用的靶标,受损后可启动 GCD 的发生^[2]。IRI 对 EC 免疫学功能有何影响,对于阐明缺血再灌注诱导 GCD 的机理可能具有重要意义。益生注射液是一种结构式清楚、含量固定的天然成分组方药物,体内外实验已证明,其可降低血液粘度,减轻 EC 缺血再灌注损伤,延缓减轻移植物慢性病理改变的发生发展^[3-6]。但其对 EC 免疫学功能的影响尚未作研究。IRI 实质上是氧和营养物质匮乏后再给予的过程,我们用人脐带静脉内皮细胞缺氧再给氧模型^[6],体外研究缺氧再给氧对 EC 免疫学功能的影响,并观察益生注射液的干预效果。

材料与方法

1 药物、试剂与仪器 益生注射液(有效成分提取自夏至草 *Lagopsis supine* (Steph.) IK. -Gal., 红陈艾 *Artemisia selengensis* Turcz. 等多味中药。20mg/ml,批号 20010209,由成都药物制剂研究所研制),复方丹参注射液(20g/10ml,批号 001208,每毫升含相当于原生药丹参、降香各 1g,华西医科大学制药厂),人脐静脉内皮细胞株 ECV304(中国科学院上海细胞库提供),RPMI 1640 培养基,无糖 RPMI1640 培养基(GIBCO)。

FITC 标记抗 HLA-ABC、抗 HLA-DR、CD54、CD86 单克隆抗体(PharMingen),羊抗核因子- κ B(NF- κ B)多抗(Santa Cruz Biotechnology Inc.),羊抗 NF- κ B 多抗(Santa Cruz Biotechnology Inc.),FITC 标记兔抗羊 IgG(美国 Vector Laboratories)。

倒置相差显微镜(OLYMPUS IX50),流式细胞仪(型号 Elite ESP,美国 EPJCS 公司产品);Topcount(微孔板液闪测定仪,美国 PACKARD 公司),多光子激光共聚焦显微镜(MRC1024-ES,BioRad 公司)。

2 方法

2.1 内皮细胞培养和缺氧再给氧模型复制 参见文献^[6]。

2.2 实验分组 ECV304 用完全 RPMI1640 培养成致密单层后进行试验,缺氧再给氧组、益生组和复方丹参组 ECV304 施予缺氧再给氧,益生组和复方丹参组培养基中分别含 500 μ g/ml 益生注射液和 1.5mg/ml 复方丹参注射液,正常对照组 ECV304 未接受缺氧再给氧损伤和药物干预,以基础 RPMI 1640 在 37℃

5% CO₂ 条件下平行操作。

2.3 细胞形态学观察 在倒置相差显微镜下观察 ECV304 活细胞形态。

2.4 NF- κ B 检测 采用间接荧光染色法^[7],染色后多光子激光共聚焦显微镜观察,Image-Pro Plus 4.1.0.9 软件作荧光强度分析,结果以吸光度(A)值表示。

2.5 HLA-ABC、HLA-DR、CD86、CD54 测定 采用直接荧光染色流式细胞术^[7]。

2.6 混合内皮细胞淋巴细胞反应(mixed-endothelial cell-lymphocyte reaction, MELR) 各组处理后 ECV304 按文献方法^[8]将其制备为刺激细胞,与同种异体淋巴细胞为应答细胞混合培养,³H-TdR 掺入法 Topcount 检测淋巴细胞增殖强度,CD95⁺ CD3⁺ 双标记直接荧光染色流式细胞仪计数凋亡淋巴细胞百分率,并收集培养上清采用 ELISA 法测定 IL-2 含量。

3 统计学方法 采用 SPSS 统计软件包进行 *t* 检验。

结 果

1 各组缺氧再给氧后 ECV304 的形态特征 缺氧再给氧组大部分细胞变圆收缩,细胞间隙明显增宽,部分细胞脱落。益生组大部分细胞成片贴壁生长,但细胞间隙仍较宽,少部分细胞变圆收缩;复方丹参组 ECV304 生长情况与益生组相似,但变圆收缩细胞较多。而正常对照组 ECV304 细胞呈单层铺路石状生长,细胞间连接致密。

2 各组 ECV304 NF- κ B 蛋白比较 见表 1。缺氧再给氧、益生和复方丹参组 ECV304 中 NF- κ B 表达量显著高于正常对照组,益生组、复方丹参组与缺氧再给氧组间差异无显著性(*P* 均>0.05)。缺氧再给氧组 ECV304 中 NF- κ B 表达增高,且由胞浆阳性为主转为胞核阳性为主 益生注射液对缺氧再给氧损伤进行干预后 NF- κ B 表达未下调,但核阳性细胞百分率降低,以核浆阳性为主,对照药复方丹参注射液干预后,变化趋势与益生注射液干预结果大致相同。

表 1 各组 ECV304 NF- κ B 表达的比较 (*A*, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	NF- κ B
正常对照	4	1291.009 $\pm$ 557.257
缺氧再给氧	4	2864.592 $\pm$ 663.025 *
益生	4	2283.380 $\pm$ 291.970 *
复方丹参	4	3055.423 $\pm$ 329.913 **

注:与正常对照组比较,**P*<0.01,***P*<0.001

3 各组 ECV304 表面 HLA-ABC、HLA-DR、CD 86、CD54 表达的比较 见表 2。与正常对照组比

表 2 各组 ECV304 表面 HLA-ABC、HLA-DR、CD86、CD54 表达的比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	HLA-ABC	HLA-DR	CD54	CD86
正常对照	4	38.3±19.0	2.09±0.77	11.90±9.59	0.88±0.36
缺氧再给氧	4	42.8±18.6**	2.15±0.89**	11.30±7.50	0.91±0.38**
益生	4	40.3±19.4**△△	1.77±0.58**△△	11.60±8.84△	0.69±0.23**△△
复方丹参	4	41.2±19.3**△△	1.92±0.70**△△	13.00±9.94*△△	0.73±0.29**△△

注 与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与缺氧再给氧组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

较,缺氧再给氧组 HLA-ABC、HLA-DR、CD86 增高,CD54 无显著变化。益生组 HLA-ABC 有所降低但仍高于正常,HLA-DR、CD86 降低至正常之下,CD54 轻度升高,但与正常对照组无明显差异。复方丹参组各指标变化与益生组相似,但 CD54 高于正常对照组。

4 各组 MELR³H-TdR 掺入量、凋亡淋巴细胞百分率和 IL-2 分泌量比较 见表 3。缺氧再给氧组³H-TdR 掺入量、IL-2 生成量显著增多,凋亡淋巴细胞百分率降低 益生注射液干预后各指标的变化被逆转,凋亡淋巴细胞百分率甚至高于正常对照组 ;复方丹参注射液干预后³H-TdR 掺入量与 IL-2 生成量被显著逆转,凋亡淋巴细胞百分率和缺氧再给氧组相比,差异无显著性。

表 3 各组 MELR 中³H-TdR 掺入量、凋亡淋巴细胞和 IL-2 分泌量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	³ H-TdR 掺入量(cpm)	凋亡淋巴细胞(%)	IL-2(ng/L)
正常对照	3	1561±108	2.30±0.80	15.24±1.05
缺氧再给氧	3	3465±216**	0.80±0.05*	24.46±1.58**
益生	3	1596±88△△	7.20±1.90**△	18.05±0.91**△
复方丹参	3	2796±125**△	0.90±0.10*	20.81±1.11**△

注 与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与缺氧再给氧组比较,△ $P<0.01$,

讨 论

本课题利用 ECV304 缺氧再给氧模型^[6],以复方丹参注射液^[9]为对照药物,体外研究 IRI(缺氧再给氧)对 EC 免疫学功能的影响,同时观察益生注射液的干预作用。结果显示 缺氧再给氧 EC 中 NF-κB 表达增高,且由胞浆阳性为主转为胞核阳性为主,膜表面 HLA-ABC、HLA-DR、CD86 表达上调(与文献^[10]报道相符),CD54 未见明显差异 ;益生注射液对缺氧再给氧损伤进行干预后 NF-κB 表达未下调,但表达核阳性细胞百分率降低,以核浆阳性为主,HLA-ABC 有所降低但仍高于正常水平,HLA-DR、CD86 降低至正常之下,CD54 轻度升高 ;对照药复方丹参注射液干预后,变化趋势与益生注射液大致相同。

在血管 EC 激活时 NF-κB 对多种基因(如粘附分子、细胞因子、趋化因子、生长因子和凝血因子等编码基因)起转录调节作用^[11]。本实验中缺氧再给氧损伤可能活化了 NF-κB,启动 HLA-ABC、HLA-DR、CD86

基因转录,使其表达增高 ;药物使 NF-κB 恢复非活化状态,由胞核转入胞浆,故这些蛋白分子表达下调。缺氧再给氧后 HLA 分子的诱生使 EC 潜在的抗原提呈功能被激发,宿主识别供者抗原的直接途径得以加强,同时 HLA 抗原的表达上调意味着移植物的免疫原性加强,血管内皮上 CD86 与 T 细胞 CD28 结合能为 CTL 和 T_H 细胞的成熟提供必要的共刺激信号,其表达增多有利于受者 T 细胞的识别与活化。益生注射液通过改善 EC 缺氧再给氧损伤^[6],使维持较正常的免疫学状态,有利于弱化移植后免疫排斥反应。本实验发现,缺氧再给氧后粘附分子 CD54 表达无明显变化,用药后轻度上调,可能因其转录表达中尚存在其他调节机制所致。

EC 与活化淋巴细胞间相互作用是移植排斥的中心环节^[12],利用 MELR 发现 淋巴细胞对缺氧再给氧损伤 EC 的增殖反应增强,IL-2 分泌量增加,益生注射液干预后淋巴细胞增殖强度和 IL-2 分泌量降至接近正常水平,与复方丹参注射液干预效果相似。提示缺氧再给氧损伤的确影响了 EC 的免疫学功能,使其活化同种异体淋巴细胞的能力增强,而益生注射液抑制了这一过程的发生。另还发现与缺氧再给氧 EC 混合培养的淋巴细胞发生凋亡的百分率比与正常 EC 反应者更低(0.8% vs 2.3%),复方丹参组无明显变化(0.9%),而益生注射液干预后升高(7.2%),该药是否可增强 EC 诱导其遭遇的同种异体淋巴细胞发生凋亡而保护移植,有待深入研究。

非免疫因素 IRI 使受损 EC 多种免疫相关分子的表达发生明显变化,EC 抗原性及抗原递呈功能加强,间接影响了排斥反应发生中的免疫学机制。益生注射液可使 EC 保持相对正常的免疫学功能,可能是其抗 GCD 发生的机制之一,有待于在大动物 GCD 模型中作进一步探讨。

参 考 文 献

1 Nagano H, Tilney NL. Chronic allograft failure : the clinical problem. Am J Med Sci 1997 ;313(5) :305—309.

2 蒋红梅,蔡美英. 内皮细胞的免疫学功能. 微生物学免疫学进展 2001 ;29(3) :80—82.

- 3 步 宏,陈卫国,刘于宾,等. 益生注射液抗大鼠腹主动脉移植硬化的实验研究. 华西药理学杂志 2000 ;15(3):185—187.
- 4 杨华蓉,陈嘉钰,蔡绍晖,等. YMB 注射液对大鼠血液流变学的影响. 华西医科大学学报 2000 ;31(2):230—233.
- 5 蒋红梅,李 明,李幼平,等. 人离体睾丸缺氧再给氧损伤实验观察及干预研究. 中国修复重建外科杂志 2001 ;15(6):377—380.
- 6 李胜富,蒋红梅,李幼平,等. 人内皮细胞缺氧再给氧损伤及益生注射液对其拮抗机理研究. 华西医科大学学报 2002 ;33(2):215—219.
- 7 谢锦玉主编. 现代细胞化学技术及其在中医药中的应用. 北京 中医古籍出版社,1998:113—115.
- 8 朱立平,陈学清. 免疫学常用实验方法. 北京 人民军医出版社,2000:120—189,278—314,342—398,431—441.
- 9 金 晶. NF κ B 的研究进展. 国外医学药学分册 2000 ;27(3):133—135.
- 10 李幼生,黎介寿,李 宁,等. 丹参对低温保存小肠的保护作用. 中华实验外科杂志 1997 ;14(3):178—180.
- 11 Goes N, Urmson J, Ramassar V, et al. Ischemia acute tubular necrosis induces an extensive local cytokine response evidence for induction of interferon-gamma, transforming growth factor-beta 1, granulocytemacrophage colony-stimulating factor, interleukin-2 and interleukin-10. Transplantation 1995 ;59:565—571.
- 12 Duquesnoy RJ, 李幼平,主编. 移植免疫生物学. 北京 科学出版社,2000:269—281.

(收稿 2002-03-24 修回 2003-03-10)

(上接第 448 页)

晚近研究发现 38% 的再狭窄病变中 p53 蛋白失活^[6], 这说明再狭窄的形成与 PTCA 术后 p53 蛋白失活, 导致 SMC 凋亡障碍而过度增殖有关。本实验的上述结果说明心脉通能促进家兔颈动脉内皮损伤后野生型 p53 基因高表达。有研究表明用野生型 p53 基因导入体外培养的兔血管 SMC, 表达后使 SMC 的 S 期细胞数下降, G₀/G₁ 期细胞增加, 提示野生型 p53 基因能有效地通过阻止细胞进入 S 期而抑制细胞过度增殖^[7]。本文作者的另一研究从细胞凋亡时相中亦发现细胞凋亡出现于野生型 p53 基因高表达之后, 这提示细胞凋亡可能与野生型 p53 基因高表达有关。心脉通能有效防治再狭窄, 其作用机理可能是促进野生型 p53 基因高表达之后, 将细胞封闭在 G₁ 期, 诱导 SMC 凋亡, 使 S 期细胞数减少, 从而使 SMC 增殖速度减慢, 达到抑制 SMC 过度增殖, 减少再狭窄的发生。

(对崔连群、段文昌、李国华、胡维城、阎晓梅、高梅、宁美芳、蔡卫东、徐希云、史大卓、徐浩在实验中给予的支持和热情帮助, 致以衷心感谢)

参 考 文 献

- 1 张文高, 邵念方, 管昌益, 等. 中医药防治经皮腔内冠状动脉

成形术后再狭窄的现状和思路. 山东中医药大学学报 2000 ;(1):7—9.

- 2 Fishman JA, Ryan GB, Karnovsky MJ. Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening. Lab Invest 1975 ;32:339—351.
- 3 张金萍, 寻玉凤, 高英茂. 程序性细胞死亡与基因. 济宁医学院学报 1997 ;20(3):68—70.
- 4 唐蔚青, 王 抒, 黎 健. 野生型 p53 基因导入诱导血管平滑肌细胞凋亡. 中国动脉硬化杂志 1997 ;5(3):194—198.
- 5 邹飞雁, 杨和平, 涂玉林, 等. 动脉粥样硬化的平滑肌细胞凋亡的研究进展. 中国动脉硬化杂志 1997 ;5(1):75—79.
- 6 刘凡光, 祝善俊, 李天德. 血管成型术后平滑肌细胞增殖的机制. 国外医学心血管疾病分册 1997 ;24(6):10—12.
- 7 蒋 雷, 夏永静, 黎 健. 野生型 p53 基因导入对培养的兔血管平滑肌细胞生长的抑制作用. 中华心血管病杂志 1997 ;25(4):301—304.

(收稿 2002-01-08 修回 2003-03-10)