

# 巨噬细胞对内皮细胞部分生物学特性的影响

刘亮 王颖 张晓启 刘旭盛

**【摘要】** 目的 建立人巨噬细胞系(U937)与人脐静脉血管内皮细胞系(ECV304)体外共培养模型,以伴刀豆球蛋白A(ConA)作为U937细胞激活剂,观察其调节血管生成的可行性。方法 培养ECV304细胞至60%融合,分别加入ConA 25 μg/mL、U937细胞(1×10<sup>5</sup>个)、U937细胞(1×10<sup>5</sup>个)+ConA 25 μg/mL,共同培养48 h。以常规培养的ECV304细胞为对照组。用流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡的变化;采用氘标记胸腺嘧啶脱氧核苷掺入法检测内皮细胞DNA合成情况;用反转录-聚合酶链反应技术检测内皮细胞同源盒HOXB2基因mRNA的表达。结果 ConA+U937细胞可使ECV304细胞S期百分比升高至(48.860±2.290)%,与对照组(41.590±2.590)%比较,差异有统计学意义(P<0.01);DNA合成亦明显增加[放射性荧光闪烁计数值为(5694±917)min<sup>-1</sup>],与对照组[(2498±1109)min<sup>-1</sup>]比较,差异有统计学意义(P<0.01);内皮细胞HOXB2基因mRNA的表达水平为0.947±0.003,与对照组0.646±0.004比较,差异有统计学意义(P<0.01)。各组细胞凋亡率相近(P>0.05) 结论 经ConA活化的U937细胞可促进ECV304细胞增殖进而调节血管生成,HOXB2与内皮细胞增殖有密切关系。

**【关键词】** 巨噬细胞; 内皮细胞; 共同培养技术

**Influence of macrophages on some biological features of endothelial cells** LIU Liang, WANG Ying, ZHANG Xiao-qi, LIU Xu-sheng. Department of Burns, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, P. R. China

Corresponding author: LIU Xu-sheng, 510080, Email: liuxusheng2002@hotmail.com, Tel: 020-87332200-8235

**【Abstract】** Objective To establish the co-culture model of human macrophage cell line (U937) with human vein umbilical cell line (ECV304), and to explore the feasibility of using concanavalin A (ConA) as U937 cell stimulator in regulating angiogenesis. Methods ECV304 cells were cultured in vitro, and to which were respectively added U937 cells (1×10<sup>5</sup>), 25 μg/mL ConA, and U937 cell (1×10<sup>5</sup>) + ConA (25 μg/mL) after cell fusion rate reaching 60%, and then co-cultured for 48 hours. ECV 304 cells in conventional culture were used as controls. <sup>3</sup>H-TdR incorporation test was employed to determine the DNA synthesis of vascular endothelial cells. Flow cytometry was used to determine the changes in the cell cycle, and RT-PCR was adopted to determine the expression of homebox (HOXB2) mRNA. Results After conA stimulation to ECV 304 co-culture with U937 cells, the percentage of cells in S phase (48.860±2.290), the DNA synthesis [(5694±917)min<sup>-1</sup>], and the expression of HOXB2 mRNA (0.947±0.003) were obviously higher than those in control group [41.590±2.590 vs (2498±1109)min<sup>-1</sup> vs 0.646±0.004, P>0.01]. There was no obvious difference in apoptosis among above stimulation methods (P>0.05). Conclusion U937 cells activated by ConA can promote the proliferation of ECV304 cells and further regulate angiogenesis. HOXB2 gene is closely related to the endothelial proliferation.

**【Key words】** Macrophages; Endothelial cells; Technique of co-culture

巨噬细胞在创伤愈合过程中,参与了病理生理创伤愈合及许多情况下的新生血管生长<sup>[1]</sup>。以往多采用单一细胞因子进行相关研究,本实验拟建立人

巨噬细胞系(U937)与人脐静脉血管内皮细胞系(ECV304)体外共培养模型,观察巨噬细胞对内皮细胞部分生物学特性的影响,探讨巨噬细胞调节血管生成的机制。

基金项目:国家重点基础研究发展规划(G1999054205)

作者单位:510515 广州,南方医科大学南方医院烧伤科(刘亮、王颖);沈阳武警辽宁总队医院烧伤科(张晓启);广州中山大学第一附属医院烧伤科(刘旭盛)

通讯作者:刘旭盛,510080, Email: liuxusheng2002@hotmail.com, 电话:020-87332200-8235

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞来源

U937细胞来源于中国科学院上海细胞生物研究所细胞库(TCHu59), ECV304细胞(ATCC, RI-

1998)取自重庆西南医院全军烧伤研究所内皮细胞培养室。

1.2 共培养模型建立及分组

将 ECV304 细胞接种到 6 孔培养板和 50 mL 培养瓶中,待 60% 融合时,加入 U937 细胞( $1 \times 10^5$  个)和伴刀豆球蛋白 A (ConA, 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),共同培养 48 h。另设 ECV304 细胞 + ConA (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 组、ECV304 细胞 + U937 细胞( $1 \times 10^5$  个)组、常规培养的 ECV304 细胞对照组,培养时间同上。每组设 3 个复孔。洗去 U937 细胞和 ConA,用 25 g/L 胰蛋白酶消化 6 孔板中的 ECV304 细胞进行细胞周期检测;裂解培养瓶中的细胞提取 RNA, -20  $^{\circ}\text{C}$  保存。

1.3 检测指标

1.3.1 ECV304 细胞周期检测 待测细胞经常规消化后,加入 20  $^{\circ}\text{C}$  体积分数 70% 乙醇固定,加等体积碘化丙啶,4  $^{\circ}\text{C}$  放置 30 min 以上,300 目筛网过滤去除成团细胞,用流式细胞仪 (FACS420 型,美国 Bio-Rad 公司)进行 DNA 细胞周期分析。

1.3.2 ECV304 细胞 DNA 的合成 参照试剂盒 (北京中国原子能研究院)说明书进行操作。在待测细胞中加入氚标记胸腺嘧啶脱氧核苷  $2.96 \times 10^4$  Bq,培养 12 h 后终止反应。吸弃培养液,常规清洗、消化,用“9999”型纤维滤纸经 ET-II 型微量细胞收集仪收集细胞。滤纸烘干后分别置于闪烁瓶中,加入二苯恶唑/对次苯基苯恶唑二甲苯闪烁液,在液体闪烁计数器 (LS6500 型,美国 Beckman 公司)上测定放射性荧光闪烁计数值 (cpm),结果以 cpm 及掺入率表示。

1.3.3 ECV304 细胞 HOXB2 mRNA 的表达 用 Tripure 分离试剂提取待测细胞中的总 RNA。反转录-聚合酶链反应按试剂盒 (美国 Promega 公司)说明书进行扩增。HOXB2 引物<sup>[2]</sup>由日本 TaKaRa 公司合成。以  $\beta$  肌动蛋白作为内参照配制总反应体系,加入相应 RNA 模板,同条件下进行扩增反应。扩增产物于 15 g/L 琼脂糖凝胶中电泳 (溴化乙啶显色),利用凝胶图像分析系统对样本进行分析。通过目的

基因与内参照的积分吸光度比值表示 mRNA 的相对表达量。

1.4 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 10.0 统计软件对计量资料进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组 ECV304 细胞的细胞周期及细胞凋亡

ConA 对 ECV304 细胞周期无明显影响;U937 细胞可使 G1 期 ECV304 细胞增多 ( $P < 0.01$ );U937 和 ConA 共同作用,可使 ECV304 细胞 S 期百分比显著增加 ( $P < 0.01$ )。各组的细胞凋亡无明显变化。见表 1。

2.2 各组中 ECV304 细胞 DNA 合成情况

单纯 ConA 或 U937 细胞对内皮细胞 DNA 合成无明显影响,在 ECV304 细胞中加入 U937 细胞并用 ConA 刺激后,可见到明显的增强效应。见表 2。

表 2 不同组别 ECV304 细胞 DNA 合成情况 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	放射性荧光闪烁计数值 ( $\text{min}^{-1}$ )	掺入率 (%)
ECV304 组	3	2498 $\pm$ 1109	1.0 $\pm$ 0.4
ECV304 + ConA 组	3	3127 $\pm$ 780	1.4 $\pm$ 0.7
ECV304 + U937 组	3	3891 $\pm$ 2321	2.0 $\pm$ 1.4
ECV304 + U937 + ConA 组	3	5694 $\pm$ 917*	2.8 $\pm$ 1.4*
F		5.870	4.215
P		0.005	0.010

注:ECV304 为人脐静脉血管内皮细胞系,ConA 为伴刀豆球蛋白 A,U937 为人巨噬细胞系;与 ECV304 组比较,\* $P < 0.01$

2.3 各组 ECV304 细胞 HOXB2 基因 mRNA 的表达 在 ECV304 细胞中加入 ConA 和 U937 细胞,可以使 HOXB2 mRNA 表达明显增加。见表 3,图 1。

表 3 不同组别 ECV304 细胞 HOXB2 mRNA 的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	相对表达值
ECV304 组	3	0.674 $\pm$ 0.004
ECV304 + ConA 组	3	0.689 $\pm$ 0.009
ECV304 + U937 组	3	0.687 $\pm$ 0.016
ECV304 + U937 + ConA 组	3	0.947 $\pm$ 0.003*
F		577.623
P		0.000

注:ECV304 为人脐静脉血管内皮细胞系,ConA 为伴刀豆球蛋白 A,U937 为人巨噬细胞系;与 ECV304 组比较,\* $P < 0.01$

表 1 不同组别 ECV304 细胞的细胞周期变化及凋亡率 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	G1	G2	S	G2/G1	细胞凋亡率
ECV304 组	36.970 $\pm$ 3.160	21.440 $\pm$ 1.090	41.590 $\pm$ 2.590	1.920 $\pm$ 0.010	0.64 $\pm$ 0.69
ECV304 + ConA 组	34.360 $\pm$ 3.040	23.740 $\pm$ 2.570	41.900 $\pm$ 0.710	1.920 $\pm$ 0.060	0.88 $\pm$ 0.81
ECV304 + U937 组	52.860 $\pm$ 3.790*	9.030 $\pm$ 2.250	38.030 $\pm$ 1.670	1.950 $\pm$ 0.010	2.44 $\pm$ 2.70
ECV304 + ConA + U937 组	36.090 $\pm$ 3.150	15.050 $\pm$ 0.910	48.860 $\pm$ 2.290*	1.930 $\pm$ 0.010	0.33 $\pm$ 0.19
F	20.382	38.412	16.136	7.167	1.243
P	0.000	0.781	0.001	0.210	0.356

注:ECV304 为人脐静脉血管内皮细胞系,ConA 为伴刀豆球蛋白 A,U937 为人巨噬细胞系;各组样本数为 3;与 ECV304 组比较,\* $P < 0.01$

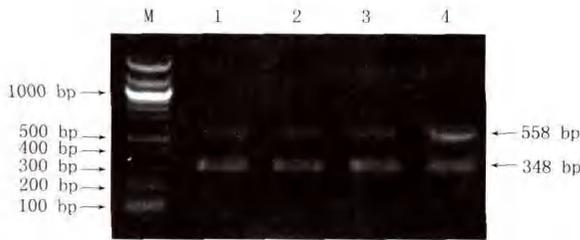


图 1 不同组别 ECV304 细胞 HOXB2 mRNA 的表达。ECV304 为人脐静脉血管内皮细胞系, ConA 为伴刀豆球蛋白 A, U937 为人巨噬细胞系; M. marker, 1. ECV304 组, 2. ECV304 + ConA 组, 3. ECV304 + U937 组, 4. ECV304 + U937 + ConA 组

### 3 讨论

创伤愈合过程受多种因素的调节和影响,有许多细胞参与这一过程。有报道,在创伤早期(伤后 24 ~ 48 h),局部组织中主要是巨噬细胞和淋巴细胞参与创面修复<sup>[3]</sup>。在此过程中,由血管内皮细胞参与的血管生成是重要环节。巨噬细胞被某些物质如细菌内毒素、ConA、纤维连接蛋白以及佛波醇酯刺激后产生巨噬细胞源生长因子,其中包含多种对内皮细胞起作用的血管生成因子。

笔者以 ConA 为刺激物,将 U937 细胞和 ECV304 细胞共同培养,观察其生物学特性的变化。结果表明,ConA 刺激的 U937 细胞可以使血管内皮细胞在细胞周期 S 期的百分比明显增加,说明处于分裂增殖的细胞增多;亦可以使血管内皮细胞 DNA 合成明显增加。证实活化的巨噬细胞可以加速细胞有丝分裂和 DNA 合成从而促进细胞增殖,起到刺激血管生成的作用。

同源盒基因最初是在果蝇中发现的,HOX 基因是胚胎发育的主控基因<sup>[4-7]</sup>。HOXB2 反义寡核苷酸可明显抑制内皮细胞的增殖,表现出剂量依赖效应,延缓了内皮细胞向 S 期的转变,在 48 h 之内可

以抑制目的基因的表达,从反面证实 HOXB2 在内皮细胞增殖中发挥重要作用<sup>[8]</sup>。ConA 刺激的 U937 细胞可以使内皮细胞的 HOXB2 mRNA 表达明显上调,表明巨噬细胞可通过调节 HOXB2 基因的表达来调控内皮细胞增殖,也进一步证实 HOXB2 在内皮细胞增殖中有重要作用。对其相关因子和信号途径的深入研究,将有利于阐明血管生成的调控机制,为临床治疗提供理论依据。

### 参考文献

- [1] Pettet G, Chaplain MA, McElwain DL, et al. On the role of angiogenesis in wound healing. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1996, 263(22):1487 - 1493.
- [2] Domenico F, Marie FP, Clemente C, et al. Relationship between DNA methylation and gene expression of the HOXB gene cluster in small cell lung cancers. *FEBS Letters*, 1996, 380(17):103 - 107.
- [3] Lingen MW. Role of leukocytes and endothelial cells in the development of angiogenesis in inflammation and wound healing. *Arch Pathol Lab Med*, 2001, 125(1):67 - 71.
- [4] Lanctôt C, Kaspar C, Cremer T. Positioning of the mouse HOX gene clusters in the nuclei of developing embryos and differentiating embryoid bodies. *Exp Cell Res*, 2007, 313(7):1449 - 1459.
- [5] Yue Y, Farcas R, Thiel G, et al. De novo t(12;17)(p13.3;q21.3) translocation with a breakpoint near the 5' end of the HOXB gene cluster in a patient with developmental delay and skeletal malformations. *Eur J Hum Genet*, 2007, 15(5):570 - 577.
- [6] Morey C, Da Silva NR, Perry P, et al. Nuclear reorganisation and chromatin decondensation are conserved, but distinct, mechanisms linked to Hox gene activation. *Development*, 2007, 134(5):909 - 919.
- [7] Jimura T, Pourquié O. Collinear activation of Hoxb genes during gastrulation is linked to mesoderm cell ingression. *Nature*, 2006, 442(3):568 - 571.
- [8] 张晓启, 刘旭盛. B2 同源盒基因反义寡核苷酸对原代脐静脉内皮细胞增殖及细胞周期的影响. *中华创伤杂志*, 2002, 18(1):47 - 48.

(收稿日期:2007-03-15)

(本文编辑:王旭)

### · 消息 ·

## 中华医学会系列杂志网上在线订阅通知

为加强中华医学会系列杂志整体品牌宣传,扩大中华医学会系列杂志的影响力,做好期刊征订工作,开辟新的发行征订渠道,方便广大读者订阅,中华医学会杂志社在中华医学网上搭建了“中华医学会系列杂志网上在线征订在线支付平台”,现已正式开通。在线订阅不仅改变了原有单一的邮局征订渠道,而且较传统邮局征订具有更大的优势:使期刊征订工作不再是阶段性的,可以实现全年征订;同时网上订阅减少了订阅环节,节约了时间和成本,使杂志订阅更加便捷。欢迎广大读者网上在线订阅中华医学会系列杂志,订阅办法:请登陆中华医学网 <http://www.medline.org.cn/>,点击“在线订阅”或登陆 <http://ebook.medline.org.cn/>进行在线订阅和在线支付。网上订阅 2008 年全年杂志的订户将享受 9 折优惠。联系电话:010 - 85158339, 85158299, 传真:010 - 85158391, 电子邮件地址:info@cma.org.cn

中华医学会杂志社