

IL-1 α 体外诱导血管内皮细胞衰老及其机理初步探讨

姚爱玉^{1,2} 周建军² 刘亚兵² 周柔丽^{1**} 丰美福^{2**}

1. 北京大学医学部基础医学院细胞生物和医学遗传系, 北京 100083;

2. 中国科学院动物研究所生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100080

摘要 IL-1 α 是一种重要的促炎性细胞因子,它具有广泛的生物学效应,作用于机体多个系统,可参与免疫调节,介导炎症反应及致热作用;可促进一些细胞增殖而抑制另一些细胞增殖.研究IL-1 α 长期刺激血管内皮细胞的效应,发现与衰老相关的 β -半乳糖苷酶染色反应阳性;形态学上细胞变得扁平、不规则,细胞质胀大,有些细胞出现双核现象;流式细胞术检测结果表明83.18%细胞停滞在G₀-G₁期,S期细胞减少;利用彗星电泳检测到被诱导衰老的内皮细胞DNA严重损伤.对IL-1 α 诱导内皮细胞衰老机理的探讨发现被诱导的衰老细胞内活性氧水平升高,脂质过氧化物增多;而抗氧化酶活力下降且总的抗氧化能力显著下降,这就造成了细胞损伤并诱发导致了细胞的退行性变化,即衰老的发生.此研究为衰老的炎症假说在细胞水平提供了直接的证据,并为抗衰老及其相关疾病的防治提供了理论基础和实验依据.

关键词 IL-1 α 内皮细胞 衰老 活性氧 抗氧化系统

IL-1是一种重要的促炎症细胞因子,它可由单核细胞、巨噬细胞、表皮细胞、B细胞、成纤维细胞等多种细胞合成和分泌.IL-1具有广泛的生物学效应,作用于机体多个系统,可参与免疫调节,介导炎症反应及致热作用;可促进一些细胞增殖而抑制另一些细胞增殖^[1~6].IL-1的这些生物学功能是通过IL-1受体介导并与即刻早期基因包括*IPG-9*,*c-jun*,*NAK-1*和*Egr-1*等^[6,7]的表达有关.

血管内皮细胞位于血管壁的内衬,具有IL-1-I型受体和IL-1受体辅助蛋白,受激后产生的形态学和生理学变化非常引人关注.内皮细胞受到IL-1刺激活化时,迅速合成IL-8等炎性细胞因子,促使骨髓释放中性粒细胞,激活淋巴细胞并介导多种炎症效应^[8].炎症反应是宿主细胞限制感染,去除异物的有效免疫方式,在炎症反应过程中有一个高代谢过程,会产生大量的活性氧(ROS)以破坏消灭入侵者^[9];而ROS被认为是导致细胞衰老的重要原

因^[10].衰老的氧化胁迫假说认为过剩的活性氧会破坏细胞的结构与功能,导致细胞退行性变化即衰老的发生.

正常情况下,细胞内不断产生活性氧,但并未造成严重损害,其原因之一在于抗氧化机制的存在.有报道表明在许多组织和细胞中抗氧化酶的活力随着衰老而下降,而且组织和细胞损伤也加剧,所以认为抗氧化酶活力下降是损伤以及衰老的一个原因^[11~13].但也有报道抗氧化酶在衰老时增加或没有改变^[14~15].在IL-1 α 诱导的内皮细胞衰老中,氧化与抗氧化系统究竟如何变化?

本文利用 β -半乳糖苷酶染色、流式细胞术、彗星电泳等方法对IL-1 α 这一促炎症因子长期刺激人脐静脉内皮细胞(HUVECs)的生物学效应进行研究.进一步对IL-1 α 诱导衰老的机理作了初步探讨,这将有助于阐明炎症与衰老的相互关系.

2003-02-27 收稿, 2003-06-02 收修改稿

** 联系人, E-mail: fengmf@panda.ioz.ac.cn, rlzhou@bjmu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 细胞培养和鉴定^[16]

原代细胞分离自24 h内新生儿脐带, 静脉内皮细胞经由IV型胶原酶(Gibco, USA)消化而获得; 细胞用M199(Gibco, USA)培养, 并补充终浓度为20%的胎牛血清(Hyclone, USA), 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内皮细胞生长因子(Roche, Germany), 0.03% L-谷氨酰胺, 0.6% Hepes, 0.2% NaHCO_3 , $10^{-5}\text{mol}/\text{L}$ 胸腺嘧啶(Sigma, USA)和100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 肝素钠. 每3天换一次液. 实验所用细胞均为4代以内细胞. 细胞通过形态学观察和细胞内特异性表达的VIII因子间接免疫荧光标记流式分析来鉴定. 操作按流式细胞仪(FACSCalibur, BD, USA)使用规程进行, 采样控制和数据分析用BD公司提供的软件CellQuest Versions 3.0进行.

1.2 IL-1 α 对内皮细胞的刺激和衰老细胞的鉴定

在长成单层的HUVECs培养体系中加入终浓度为20 ng/mL的IL-1 α (RD System, USA)进行持续性刺激, 其间换液如常, 补充相应浓度的IL-1 α . 所有的处理细胞及平行对照细胞均在同一时间收获分析.

对衰老细胞的鉴定依据Dimri和Serrano提出的方法^[17,18]. 用PBS(pH 7.2)洗单层细胞一次, 再以PBS(pH 7.2)配置的0.5%的戊二醛固定5 min, 然后用PBS(pH 7.2, 含1 mmol/L的 MgCl_2)洗一遍; 在新鲜配置的X-gal(Roche, Germany)染液(pH 6.0)中染色, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育12~16 h.

1.3 细胞周期分析

消化收获细胞, 1000 g离心弃上清, 用无钙镁的PBS洗两遍, 重悬于500 μL 的PBS中, 缓慢加入5 mL冷乙醇, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜. 取 5×10^6 细胞, 1000 g离心弃乙醇, 用5 mL的PBS(含1%牛血清)洗两遍; 加入100 μL 的500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 碘化丙啶(PI)溶液, 100 μL 浓度为10 mg/mL的RNase A, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min. 流式细胞术分析采用的激发光为488 nm, 发射光为570 nm, 细胞流速不超过60个/min; 数据用BD公司提供的Modifit 2.0分析^[19].

1.4 彗星电泳(单细胞电泳)分析DNA损伤

首先在冰冻玻片上铺上100 μL 1%的正常溶点凝胶, 在室温下静置5 min. 将6 μL 细胞悬液(2×10^6 细胞/mL)与54 μL 1%的低溶点凝胶在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下充分混匀后铺在第一层凝胶上, 在4 $^{\circ}\text{C}$ 静置

8 min. 玻片在裂解液(2.5 mol/L NaCl, 100 mmol/L $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 10 mmol/L Tris, 1% sodiumlaurylsarcosine, 1% Triton X-100, pH 10)中4 $^{\circ}\text{C}$ 作用1 h. 然后玻片在解旋溶液(1 mmol/L Na_2EDTA 和300 mmol/L NaOH pH 13)中37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下作用1 h; 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下电泳30 min. 玻片最后在0.4 mol/L Tris-HCl缓冲液中中和5 min, 用SYBR Green(Molecular Probes, USA)染色. 荧光显微镜观察并分析, 用尾矩(tail moment)即尾部DNA的比例与头部中心到尾部中心距离的乘积来表示DNA损伤程度^[20].

1.5 细胞内ROS的测定

同上消化收获细胞后加0.4 μL 的0.5 mmol/L的CM-H₂DCFDA(Molecular Probes, USA)到0.4 mL(3×10^5 细胞/mL)细胞悬液中至终浓度0.5 nmol/L, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育5~10 min; 在用流式细胞仪检测前5 min加入PI(终浓度10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 然后采用流式细胞术检测(激发光517或488 nm, 发射光535 nm), 取PI阴性的细胞群分析ROS的变化.

1.6 脂质过氧化物丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和总抗氧化能力(T-AOC)的测定

根据南京建成生物工程研究所生产的MDA, SOD, GSH-Px和T-AOC试剂盒说明书进行测定.

1.7 数据处理和统计分析

数据采用平均数 \pm 标准差表示, 以双尾 t 检验进行平均数差异的显著性分析, 统计处理采用Microsoft Excel 2000软件. $P < 0.05$ 为有显著性差异.

2 结果

2.1 HUVECs的培养和鉴定

内皮细胞原代需长5~7 d, 以后1:3传代. 一般情况下内皮细胞在体外培养10代以后开始自行形态变异, 功能衰退, 因此所有实验均采用4代以前的细胞. 以内皮细胞形态呈现多角型的铺路石状特征和其胞浆中表达VIII因子为指标来鉴定内皮细胞的纯度, 以区别原代分离培养时可能混入的成纤维细胞. 间接免疫荧光标记的流式分析表明98.75%的实验细胞为内皮细胞来源(图1).

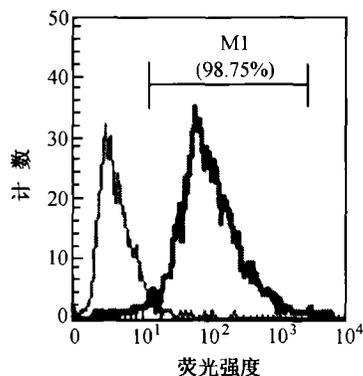


图1 FITC间接标记的抗人VIII因子染色的HUVECs流式细胞术鉴定结果

左侧峰代表阴性对照, 右侧峰代表间接荧光标记的细胞, 统计表明有绝大多数细胞(98.75%)内有人VIII因子表达. 为3次实验平均值

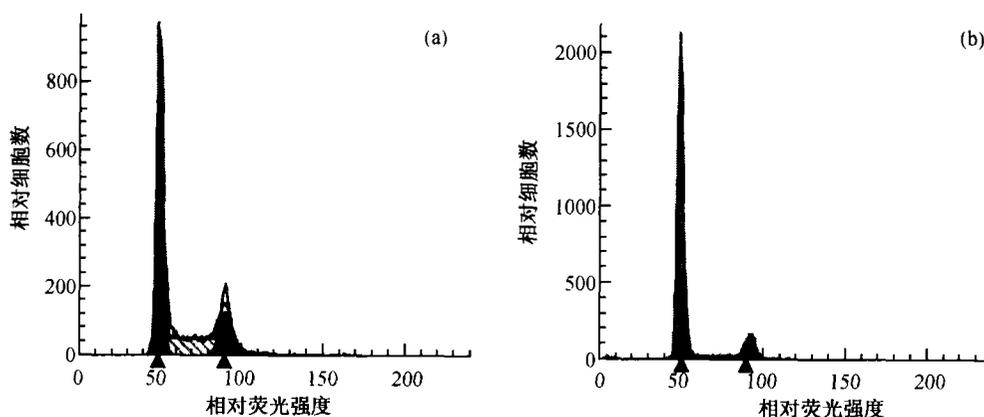


图2 流式细胞术检测细胞周期

(a) 未诱导的 HUVECs, 左侧峰为二倍体峰对应于 G₀-G₁ 期, 右侧为四倍体峰, 对应于 G₂-M 期, 中间为 S 期;
(b) IL-1 α 诱导衰老的 HUVECs 比 (a) 图有更多的细胞滞留在 G₀-G₁ 期, 同时 S 期细胞近于消失

2.4 彗星电泳分析 DNA 损伤

彗星电泳是一种用于检测单细胞水平 DNA 损伤的技术, 以其快速、简便、灵敏等诸多优点成为分子监测的重要手段. 在衰老的细胞中往往出现 DNA 断裂损伤^[21,22]. 图版 I B 显示对照细胞没有 DNA 损伤, 其荧光在细胞内, 而 IL-1 α 诱导衰老的 HUVECs 由于 DNA 的断裂而迁移出细胞产生带有荧光的彗星尾部.

2.5 细胞内 ROS 的测定

ROS 的生成是通过应用改良的二氯荧光素 (H₂DCFDA) 作为探针来检测的. 如图所示, 活性氧在细胞内的产生与猝灭处于动态变化, 在 IL-1 α 短时间刺

2.2 衰老细胞的鉴定

β -半乳糖苷酶染色实验表明, 85% 的内皮细胞在 IL-1 α 的持续慢性刺激下呈现出细胞浆特异性蓝色, 表明 IL-1 α 诱导 HUVECs 进入衰老状态(图版 I A).

2.3 细胞周期分析

HUVECs 在 IL-1 α 的持续慢性刺激下生长逐渐趋于停顿, 分裂相少见, 有些细胞中能观察到双核. 用 X-gal 染液染色证明大部分细胞进入衰老状态后, 取衰老细胞和同样来源的对照细胞经 PI 染色, 通过细胞 DNA 含量来判断细胞周期时相. 流式细胞仪分析表明 IL-1 α 诱导衰老的 HUVECs G₀-G₁ 期细胞占 83.18%, G₂-M 期细胞占 8.25%, S 期细胞占 8.57%; 而对照 HUVECs G₀-G₁ 期细胞占 59.02%, G₂-M 期细胞占 14.21%, S 期细胞占 26.78%. 可见细胞周期向 G₀-G₁ 停滞, S 期趋于消失(图 2).

激时出现震荡, 最终衰老细胞 ROS 明显高于未刺激的对照(图 3).

2.6 脂质过氧化物 MDA 的分析

MDA 是膜脂过氧化的主要产物之一, 人们常以 MDA 作为判断膜脂过氧化程度的一项重要指标. 在 IL-1 α 诱导的衰老细胞中 MDA 含量显著高于对照组(表 1).

2.7 SOD, GSH-Px, T-AOC 的测定

IL-1 α 诱导的衰老组 SOD 的产生(6.69 \pm 0.61) 比对照组(9.47 \pm 0.3) 要低, 衰老组 GSH-Px (112.1 \pm 4.27) 比对照组(148.0 \pm 3.98) 亦降低,

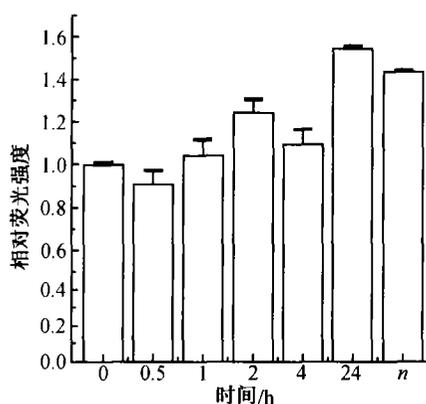


图3 分析 IL-1 α 作用于内皮细胞不同时间后的 ROS 变化
0 为对照组 ROS, n 为 IL-1 α 诱导的衰老细胞 ROS, 高于对照组. ROS 在刺激的 24 h 内震荡变化. 均为 3 次测试平均值

衰老组 T-AOC 的活性 (15.2 ± 1.2) 比对照组 (32.8 ± 1.1) 也低, 且均具有显著性差异 ($p < 0.05$) (表 1).

表 1 对照组和 IL-1 α 诱导的衰老组 MDA, SOD, GSH-Px 和 T-AOC 的比较^{a)}

测定指标	对照组	衰老组
MDA(nmol/mg 蛋白)	2.57 ± 0.05	3.39 ± 0.06
SOD(U/mg 蛋白)	9.47 ± 0.30	6.69 ± 0.61
GSH-Px(U/mg 蛋白)	148.00 ± 3.98	112.10 ± 4.27
T-AOC(U/mg 蛋白)	32.8 ± 1.1	15.2 ± 1.2

a) 均为 3 次实验的平均值

3 讨论

IL-1 α 具有广泛的生物学效应, 作用于机体多个系统, 可参与免疫调节, 介导炎症反应及致热作用^[1-3]. 它还可促进或抑制不同类型细胞的增殖^[4-6]. 研究发现 IL-1 α 刺激 HUVECs 15 d 以后, 细胞变得伸展不规则, 胀大, 有些细胞出现双核; β -半乳糖苷酶染色 85% 的细胞呈现阳性; 83.18% 的细胞周期停滞在 G₀-G₁ 期; 彗星电泳检测到 DNA 断裂损伤严重; 因此说 IL-1 α 的持续慢性刺激能引起 HUVECs 的衰老.

那么 IL-1 α 诱导内皮细胞衰老的原因是什么呢? IL-1 α 在炎症反应时使 ROS 增加, IL-1 α 诱导的衰老中也伴随着 ROS 的增加, 而 ROS 是导致衰老的主要原因^[10], 这提示 ROS 是炎症与衰老相关联的共同点. ROS 的升高可有两个重要效应, ROS 可以作为第二信使介导特定的信号通路, 它还可以攻击和严重损害各种各样的细胞分子. 在炎症反应中,

炎症细胞常产生呼吸爆发, 一方面以充足的能量供应支持活化的细胞, 强化细胞本身的功能, 另一方面 ROS 本身即是很有效的攻击性物质, 利于抗击感染等侵害, 这是进化中生存竞争的必然结果. 但是 ROS 是一个双刃剑, 它引起各种分子的损伤包括膜脂、细胞蛋白质、DNA, 从而诱发细胞的衰老. 本实验结果还表明脂质过氧化物 MDA 也显著增加, 它可导致细胞膜通透性和稳定性受到破坏, MDA 本身还可与膜蛋白、酶发生交联反应使细胞新陈代谢发生障碍, 从而导致衰老. 另外, 脂质过氧化物分解的过程会产生更多的脂质过氧化自由基, 通过链式反应放大活性氧的作用.

正常情况下, 细胞内不断产生活性氧, 但并未造成严重损害. 其原因之一在于抗氧化机制的存在. ROS 产生与清除的对抗使活性氧在 IL-1 α 刺激的短时间内起伏震荡, 但 IL-1 α 长时间刺激使细胞提前衰老, 总的抗氧化能力显著下降, 活性氧最终显著升高, 脂质过氧化物 MDA 也显著增加. 活性氧的产生与清除处于不平衡状态, 过剩的活性氧就会破坏细胞的结构与功能, 导致细胞退行性变化即衰老的发生. 同时, 这也提示许多抗氧化药物如维生素 E 等可用于抗衰老及其相关疾病.

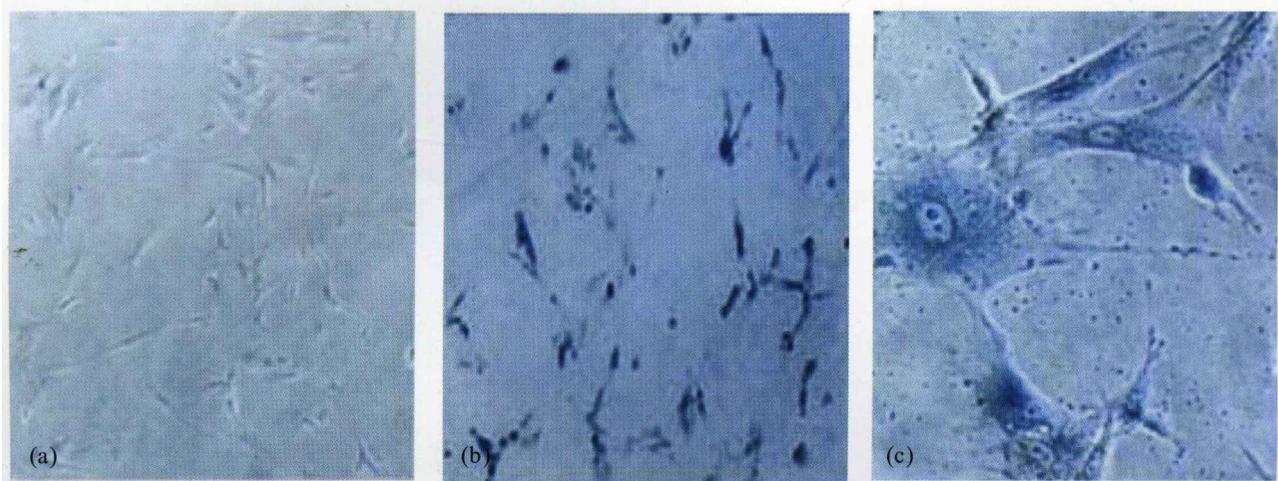
抗氧化系统有两类, 即酶促系统和非酶促系统. 其中酶促系统得到广泛关注. 有报道表明在许多组织和细胞内氧化酶的活力随着衰老而下降, 而且细胞损伤也加剧, 所以认为抗氧化酶的活力下降是衰老的一个原因^[11-13]. 但也有报道抗氧化酶在衰老时增加或没有改变^[14,15]. 在 IL-1 α 长期刺激诱导的内皮细胞衰老的过程中, SOD 和 GSH-Px 显著降低. 本文的结果支持前一观点, 认为这种长期刺激最终使抗氧化酶活性下降, 这可能是促炎症因子引起内皮细胞损伤以致衰老的一个原因. 具体的分子机制还在进一步研究中, 相关的基因组和蛋白质组学的研究将有助于解释这一过程^[23].

最近 Chung 等提出衰老的炎症假说, 认为炎症过程中的分子基础是衰老过程的一个原因^[24]. 我们的实验为这一假说提供了直接的证据, 首次论证了促炎症因子 IL-1 可诱导内皮细胞衰老, 并对 IL-1 诱导衰老的机理作了初步探讨. 同时本研究为研究炎症与衰老的关系、衰老的机理提供了一个很好的体外模型, 而且也为抗衰老研究提供了实验依据.

参 考 文 献

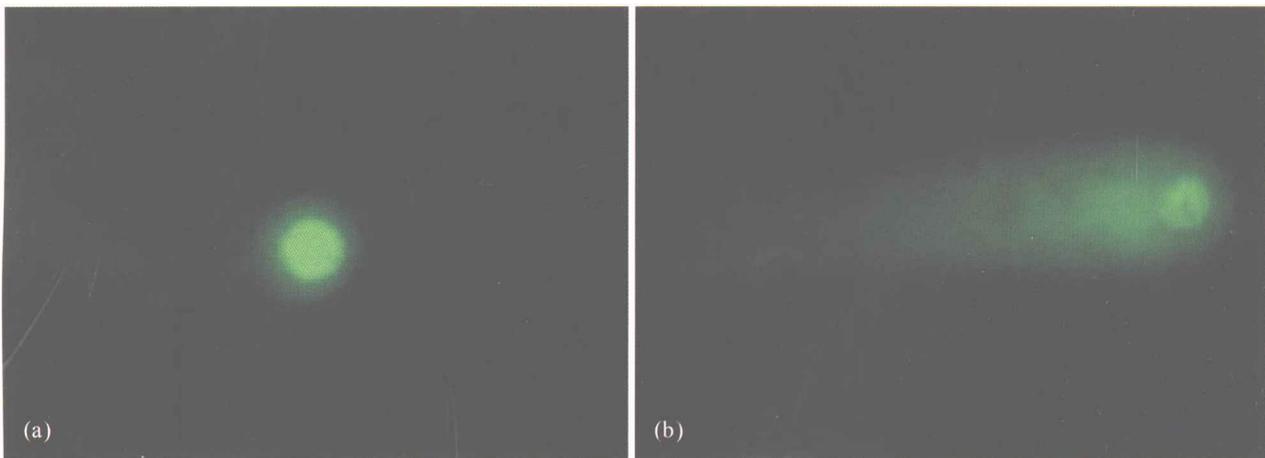
- 1 Dinarello C A, Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. Blood,

- 1991, 270: 1627
- 2 Paul W E, et al. B-cell stimulatory factor-1/interleukin 4. *Annu Rev Immunol*, 1987, 5: 429
 - 3 Folkman J, et al. Angiogenic factors. *Science*, 1987, 235: 442
 - 4 Moringa Y, et al. Antiproliferative effect of interleukin-1 on tumor cells: G₀-G₁ arrest of a human melanoma cell line by IL-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 173: 186
 - 5 Belizario J E, et al. Interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor, and transforming growth factor cytotoxicity by growth arrest in the G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res*, 1991, 51: 2279
 - 6 Rangnekar V V, et al. Antimitogenic and mitogenic actions of interleukin-1 in diverse cell types are associated with induction of *gro* gene expression. *J Biol Chem*, 1991, 266: 2415
 - 7 Muthukkumar S, et al. Interleukin-1 induces growth arrest by hypophosphorylation of the retinoblastoma susceptibility gene product RB. *J Biol Chem*, 1996, 271: 5733
 - 8 Bevilacqua M P, et al. Interleukin-1 activation of vascular endothelium. Effects on procoagulant activity and leukocyte adhesion. *Am J Pathol*, 1985, 121(3): 394
 - 9 Lum H, et al. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 280(4): C719
 - 10 Toren F, et al. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 2000, 408: 239
 - 11 Pieri C, et al. Food restriction in female Wistar rats V. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in liver. *Arch Gerontol Geriatr*, 1992, 14: 93
 - 12 Chen L H, et al. Effects of age, dietary restriction and germ-free environment on glutathione-related enzymes in Loubund Wistar rats. *Arch Gerontol Geriatr*, 1992, 14: 17
 - 13 Xia E, et al. Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male Fischer 344 rats are altered by food restriction. *J Nutr*, 1995, 125: 195
 - 14 Lammi-Keefe C J, et al. Copper-zinc and manganese superoxide dismutase activities in cardiac and skeletal muscles during aging in male rats. *Gerontology*, 1984, 30: 153
 - 15 Rao G, et al. Effect of dietary restriction on the age-dependent changes in the expression of antioxidant enzymes in rat liver. *J Nutr*, 1990, 120: 602
 - 16 Schmitt G M, et al. The effects of different fixatives for immunofluorescent and immunoperoxidase localization of factor VIII-related antigen in canine carotid artery and vascular prostheses. *Histochem J*, 1986, 18(7): 351
 - 17 Dimri G P, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 9363
 - 18 Serrano M, et al. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16. *Cell*, 1997, 88: 593
 - 19 David L S, et al. *Cell, A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998
 - 20 Atamna H, et al. A method for detecting abasic sites in living cells: Age-dependent changes in base excision repair. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 686
 - 21 Diem E, et al. Basal levels of DNA strand breaks in human leukocytes determined by comet assay. *J Toxicol Environ Health A*, 2002, 65(9): 641
 - 22 Higami Y, et al. An age-related increase in the basal level of DNA damage and DNA vulnerability to oxygen radicals in the individual hepatocytes of male F344 rats. *Mutat Res*, 1994, 316(2): 59
 - 23 Toda T. Current status and perspectives of proteomics in aging research. *Exp Gerontol*, 2000, 35: 803
 - 24 Chung H Y, et al. The inflammation hypothesis of aging: Molecular modulation by calorie restriction. *Ann N Y Acad Sci*, 2001, 928: 327



A 用 β -半乳糖苷酶活性检测细胞衰老

(a) 未诱导的对照HUVECs($\times 63$); (b) 20ng/mL的IL-1 α 持续诱导刺激15d的HUVECs, 细胞由于 β -半乳糖苷酶的作用分解底物X-gal被染成蓝色($\times 63$); (c) 放大的($\times 200$)诱导衰老HUVECs, 细胞浆特异性着蓝色, 细胞核不被着色



B 彗星实验分析DNA损伤

(a) 正常细胞没有DNA损伤, 其荧光在细胞内; (b) IL-1 α 诱导衰老的HUVECs由于DNA的断裂而迁移出细胞产生带有荧光的彗星尾部