

白介素-10对TNF- α 介导 血管平滑肌细胞增殖的影响^{*}

欧阳平¹, 杨红², 彭立胜¹, 吴文言¹, 徐安龙¹

(1. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275;

2. 广东药学院, 广东 广州 510224)

摘要: 观察重组人白介素-10 (rhIL-10) 对肿瘤坏死因子 (TNF- α) 刺激的离体大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞增殖的影响。体外培养SD大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞, 采用MTS/PES法确定血管平滑肌细胞的增殖状态。结果显示, TNF- α 对血管平滑肌细胞增殖具有明显的刺激作用。rhIL-10单独应用对血管平滑肌细胞生长没有影响。在TNF- α 刺激下, 低至10 ng/mL的rhIL-10可明显抑制血管平滑肌细胞的生长 ($P < 0.05$)。

关键词: 血管平滑肌细胞; 白介素-10; 细胞因子

中图分类号: R541 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2002) 01-0076-03

血管平滑肌细胞 (VSMC) 增殖和表型改变是动脉粥样硬化的主要病理基础。日益增多的证据表明动脉粥样硬化是一个对血管损伤的过度炎症反应。血管损伤后, 单核细胞、血小板和淋巴细胞粘附到血管壁, 释放一系列细胞因子和肽类生长因子, 这些生长调节物与他们的特异性受体结合后传导影响血管平滑肌细胞表型和生长的信号, 因此促进了晚期纤维增殖病变的发生。动脉粥样硬化病变处的血管平滑肌细胞表达HLA-DR, HLA-DR糖蛋白参与了T细胞的抗原递呈, 表明T细胞与VSMC的相互作用, 可导致动脉粥样硬化的发生^[1]。白介素-10 (interleukin-10, IL-10) 是一种具有抑制T细胞、单核细胞和巨噬细胞激活及其效应子包括单核因子的合成、NO的产生、II类MHC和共刺激分子如CD80/CD86表达等的功能, 对大多数类型造血细胞有多种作用的多功能细胞因子^[2]。本研究的目的在于确定重组人白介素-10在单独和与TNF- α 同时存在时对血管平滑肌细胞增殖的影响。

1 实验部分

1.1 材料

DMEM培养基、胎牛血清 (FBS)、 $\rho = 0.25\%$ 胰酶均购自Hyclone公司。一次性细胞培养瓶、96孔板购自Corning公司。HEPES、TNF- α 均购自Sigma公司, 重组人IL-10 (rhIL-10) 为本实验室经基

因重组、在大肠杆菌中表达、纯化后获得。实验所用的生长因子和细胞因子均用含 $\varphi = 0.5\%$ FBS的PBS重新配制, 而后用含 $\varphi = 5\%$ FBS的DMEM培养液稀释至所需的终浓度。

1.2 血管平滑肌细胞的原代培养

参考王道生^[3]贴块法进行。选用6周龄雄性SD大鼠 (第一军医大学实验动物中心提供) 断头处死, 取胸主动脉中膜以贴块法培养于含 $\varphi = 10\%$ FBS的DMEM培养基中, 置于37℃、 $\varphi = 5\%$ CO₂孵箱中培养, 一周后可见细胞从组织块边缘爬出, 2~3周出现致密细胞层, 此时即可传代, 传代细胞呈典型的“峰与谷”样生长, 细胞经抗 α -actin抗体鉴定为平滑肌细胞。实验所用的血管平滑肌细胞均为第3~6代传代细胞。

1.3 细胞增殖评价

96孔板中以5000个细胞/孔的密度铺板。8h后换成无血清、含谷氨酸的DMEM培养基, 维持48h后, 换成含 $\varphi = 5\%$ FBS的DMEM培养基及相应的实验试剂, 每组实验重复6次, 每一组每次为6个孔, 对照组为含 $\varphi = 5\%$ FBS的DMEM培养基, 24h后细胞的增殖率通过应用CellTiter 96 Assay MTS/PES试剂盒 (Promega Co. U. S. A., Cat #5421) 确定。在Bio-Rad 550型Microplate reader以490 nm测量吸光度, 细胞的增殖率用吸光度来表达。

* 收稿日期: 2001-05-14;

基金项目: 广州市科委科技攻关资助项目 (JB00000448165)

作者简介: 欧阳平 (1965—), 男, 医学博士, 讲师, 通讯联系人, 徐安龙, E-mail: ls36@zsu.edu.cn

1.4 统计学分析

资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 软件包, 采用 ANOVA 和 Student Newman Keuls 检验分析。

2 结果与讨论

2.1 TNF-α 和 rhIL-10 分别对 VSMC 增殖的影响

单独的 rhIL-10 在不同剂量下对大鼠 VSMC 的增殖均无影响 ($P > 0.05$); 100 ng/mL 和 20 ng/mL 的 TNF-α 单独作用时均可明显刺激 VSMC 的增殖, 与对照组相比有显著性差异 (见表 1)。

表 1 rhIL-10 或 TNF-α 分别
对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响¹⁾

Tab 1 Effects of recombinant rhIL-10 or TNF-α
on rat vascular smooth muscle cell proliferation

组别	$\rho / (\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	λ
对照		0.781±0.436
rhIL-10	100	0.783±0.170
rhIL-10	10	0.963±0.113
rhIL-10	1	1.061±0.079
rhIL-10	0.100	0.856±0.160
rhIL-10	0.010	0.950±0.101
TNF-α	100	1.258±0.258 ²⁾
TNF-α	20	1.361±0.197 ³⁾
TNF-α	10	0.990±0.288
TNF-α	1	0.933±0.202

1) $n=6$; 2) $P<0.05$ (与对照组相比);
3) $P<0.01$ (与对照组相比)

2.2 rhIL-10 对 TNF-α 介导 VSMC 增殖的抑制作用

TNF-α (20 ng/mL) 可促进 VSMC 增殖; 而当 20 ng/mL 的 TNF-α 与 10 ng/mL 或 100 ng/mL 的 rhIL-10 同时存在时, TNF-α 促进 VSMC 增殖的作用被 rhIL-10 抑制, 与 TNF-α 组相比有显著性差异 (见表 2), 但未存在剂量依赖性。表明 rhIL-10 能够在体外抑制由 TNF-α 介导的 VSMC 增殖。实验所用细胞的台盼兰染色证实细胞处于存活状态。

血管损伤后细胞因子在血管重构中发挥重要作用, 已知在动脉粥样硬化斑块中有大量的炎症介导体。TNF 作为细胞因子家族的代表, 可从不同的炎症细胞中释放, 与正常的细胞相比较, 在动脉粥样硬化病变中的表达被上调, 本研究结果显示, TNF-α 能明显刺激 VSMC 的增殖。TNF-α 诱导 VSMC 的增殖的机理目前仍不十分清楚。作为 II 类细胞因子受体家族的成员, TNF 存在 2 个膜结合的 TNF 受体, 目前的研究表明 TNFp55 受体产生的信号介导凋亡,

TNFp75 受体通过有丝分裂素激活的蛋白激酶系统 (MAPK 系统) 促进细胞增殖⁴⁾。

表 2 rhIL-10 对 TNF-α 诱导的大鼠血管
平滑肌细胞增殖的影响¹⁾

Tab 2 Effects of recombinant rhIL-10 on rat vascular
smooth muscle cell proliferation induced by TNF-α

组别	$\rho / (\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	λ
TNF-α	1.3610.197	
NF-α+ rhIL-10	100	0.689±0.159 ²⁾
TNF-α+ rhIL-10	10	0.845±0.207 ³⁾
TNF-α+ rhIL-10	1	0.908±0.248
TNF-α+ rhIL-10	0.100	1.109±0.276
TNF-α+ rhIL-10	0.010	1.048±0.187

1) $n=6$; 2) $P<0.01$ 与 TNF-α 组相比;
3) $P<0.05$ 与 TNF-α 组相比(20 ng/mL)

已知 IL-10 主要功能是限制和最终终止炎症反应。除此之外, IL-10 尚可调节 B 细胞、NK 细胞、细胞毒 T 细胞和辅助 T 细胞、肥大细胞、中性粒细胞、树突状细胞、角化细胞和内皮细胞的生长和分化。在人 LPS 刺激的单核细胞, IL-10 抑制 IL-1、TNF、IL-6 和 IL-8 的产生, 在对健康志愿者给予内毒素后, IL-10 能够降低 LPS 诱导的体温增加和循环中的 TNF、IL-6 和 IL-8³⁾。本结果显示在大鼠胸主动脉的 VSMC, rhIL-10 能够抑制 20 ng/mL 浓度的 TNF-α 刺激的 VSMC 增殖, 与国外的报道类似⁴⁾, 而对正常非刺激情况下的 VSMC 生长无影响。

新近的研究表明, IL-10 能够抑制由 TNF-α 诱导的 MAP 激酶瀑布中 p44/42 的表达及 p38MAPK 的表达^{7,8)}。MAP 激酶细胞因子诱导血管平滑肌细胞的增殖的共同通路, IL-10 通过抑制 TNF-α 诱导的 MAP 激酶瀑布抑制 VSMC 的增殖。总之, IL-10 抑制由 TNF-α 诱导 VSMC 增殖的机制可能是多途径的。

结果表明, rhIL-10 能明显抑制由 TNF-α 诱导的大鼠 VSMC 增殖。

参考文献:

[1] LUSIS A J. Atherosclerosis[J]. Nature, 2000, 407: 233—241.
[2] MOORE K W, MALEYFYT R de W, COFFMAN R L, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor[J]. Annu Rev Immunol, 2001, 19: 683—765.
[3] 王道生. 动脉平滑肌细胞培养方法 // 徐淑云. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 353—358.
[4] BAKER S J, REIDY E P. Transducers of life and death: TNF

- receptor superfamily and associated protein[J]. *Oncogene*, 1996, 12: 1—9.
- [5] PAJKRT D, CAMOGLIO L, PIEL-VAN B M, et al. Attenuation of proinflammatory response by recombinant human IL-10 in human endotoxemia; effect of timing of recombinant human IL-10 administration[J]. *J Immunol*, 1997, 158: 8971—8977.
- [6] SELZMAN C H, MCINTYRE R C, SHAMES B D, et al. Interleukin-10 inhibits human vascular smooth muscle proliferation[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, 30: 889—896.
- [7] TAN J, TOWN J, SAXE M, et al. Ligation of microglial CD40 results in p44/42 mitogen-activated protein kinase-dependent TNF- α production that is opposed by TNF- β and IL-10[J]. *J Immunol*, 1999, 163: 6614—6621.
- [8] SATO K, NAGAYAMA H, TADOKORO K, et al. Extracellular signal-regulated kinase, stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, and p38 α are involved in IL-10-mediated selective repression of TNF- α -induced activation and maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells[J]. *J Immunol*, 1999, 162: 3865—3872.

Effects of Recombinant Human Interleukin-10 on Rat Vascular Smooth Muscle Cells Proliferation by Tumor Necrosis Factor α

OUYANG Ping¹, YANG Hong², PENG Li sheng¹, WU Wen yan¹, XU An long¹

(1. School of Life Sciences, Sun Yat-sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China;

2. Guangdong Pharmacy College, Guangzhou 510224, China)

Abstract: The purpose of this study was to determine the effects of recombinant human interleukin-10 (rhIL-10) on rat vascular smooth muscle cell proliferation stimulated by tumor necrosis factor α (TNF α). Rat aortic vascular smooth muscle cells (VSMCs) were cultured and treated with recombinant human interleukin-10 (rhIL-10) with or without tumor necrosis factor α (TNF α). Proliferation of VSMCs was quantified by colorimetric assay. The results indicated that TNF α stimulated VSMCs proliferation and rhIL-10 alone had no effect on VSMCs growth. With TNF α stimulation, rhIL-10, at dose as low as 10 ng/mL, inhibited VSMCs growth ($P < 0.05$).

Key words: vascular smooth muscle cell; interleukin 10; cytokine