

文章编号:1004-7220(2015)05-0385-07

· 论 著 ·

## TNF- $\alpha$ 促进内皮源性微体的数量与 ICAM-1 表达

吴垒磊, 庄 飞, 韩 悦, 刘妍妍, 齐颖新, 姜宗来  
(上海交通大学 生命科学技术学院, 力学生物学研究所, 上海 200240)

**摘要:** **目的** 探讨高张应变调控的肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 对内皮源性微体 (endothelial microparticles, EMPs) 数量与表面细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) 表达的作用。**方法** 采用 Flexercell 细胞张应变加载系统对大鼠胸主动脉内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 分别施加 5% (模拟正常生理状态) 和 18% (模拟高血压状态) 幅度的周期性张应变, 加载频率均为 1.25 Hz, 加载持续时间为 24 h, 实时 PCR 检测不同幅度张应变条件下 ECs 的 TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平。之后应用 TNF- $\alpha$  刺激大鼠胸主动脉 ECs, 收集上清液, 超速离心提取得到内皮源性微体 (endothelial microparticles, EMPs); 用亲脂性苯乙烯基 (lipophilic styryl) 以及透射电镜对 EMPs 进行形态鉴定; 流式细胞术对 TNF- $\alpha$  刺激产生的 Annexin V 阳性 EMPs 进行计数, 并检测 EMPs 表面 ICAM-1 的表达。**结果** 与 5% 正常张应变组相比, 18% 高张应变条件下 ECs 的 TNF- $\alpha$  表达水平显著上升。TNF- $\alpha$  能够显著上调 ECs 产生 Annexin V 阳性的 EMPs 数量, 且 TNF- $\alpha$  刺激 ECs 产生的 EMPs 表面 ICAM-1 表达量显著增加。**结论** 高张应变条件下 ECs 高表达 TNF- $\alpha$  可能介导了 EMPs 产生和表面 ICAM-1 高表达。研究结果为后续探讨 EMPs 在血管重建力学生物学机制中的作用提供新的实验证据。

**关键词:** 内皮细胞; 内皮源性微体; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 周期性张应变; 细胞间黏附分子-1

中图分类号: R 318.01 文献标志码: A

DOI: 10.3871/j.1004-7220.2015.05.385

## TNF- $\alpha$ promotes the quantity and ICAM-1 expression of endothelial microparticles

WU Lei-lei, ZHUANG Fei, HAN Yue, LIU Yan-yan, QI Ying-xin, JIANG Zong-lai (*Institute of Mechanobiology & Medical Engineering, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China*)

**Abstract: Objective** To study the role of cyclic strain-modulated tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) played in the quantity and intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression of endothelial microparticles (EMPs). **Methods** The endothelial cells (ECs) primarily cultured from rat aorta were applied with 5% cyclic strain (to simulate normal physiological condition) and 18% cyclic strain (to simulate hyper-tension condition), respectively, by using FX-4000T cyclic strain loading system for 24 hours at the loading frequency of 1.25 Hz. The mRNA expression of TNF- $\alpha$  under different amplitudes of cyclic strain was determined by real time-PCR. The TNF- $\alpha$  was then used to stimulate the ECs from rat aorta, and the supernatants were collected and ultracentrifuged to get endothelial microparticles (EMPs), which were then identified by lipophilic styryl membrane staining and transmission electron microscope for morphological identification. The quantities of Annexin V positive EMPs under TNF- $\alpha$  stimulation were counted by flow cytometer and ICAM-1 expression on EMPs was detected as well. **Results** Compared with the 5% normal cyclic strain, under 18% high cyclic strain condition, the mRNA expression of TNF- $\alpha$  in ECs increased significantly. TNF- $\alpha$  could then significantly up-regulate the production of Annexin V

收稿日期:2015-02-04; 修回日期:2015-03-18

基金项目:国家自然科学基金项目(11172178, 11222223, 11232010)。

通信作者:齐颖新, 研究员, 博士研究生导师, Tel: (021) 34204863; E-mail: qiynx@sjtu.edu.cn。

positive EMPs and promote the expression of ICAM-1 on EMPs. **Conclusions** The over-expression of TNF- $\alpha$  in ECs under high cyclic strain might mediate the high production of EMPs and over-expression of ICAM-1 on EMPs. The research findings will provide new experiment evidence for further studying the role of EPCs in the mechanobiological mechanism of vascular remodeling.

**Key words:** Endothelial cells (ECs); Endothelial microparticles (EMPs); Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ); Cyclic strain; Intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1)

内皮源性微体 (endothelial microparticles, EMPs) 是由活化或凋亡的内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 产生、直径为 0.1 ~ 1  $\mu\text{m}$  的小颗粒<sup>[1]</sup>。近年来, EMPs 在细胞间生物信息传递以及心血管疾病发病过程中的作用逐渐引起重视。体内条件下, ECs 除受到血流切应力作用外, 还受到血管周期性张应变 (cyclic strain) 的作用。研究表明, 生理状态下体内大动脉所受周向张应变为 5% ~ 10%。然而, 在高血压状态下动脉所受周向张应变升高至 15% 以上<sup>[2]</sup>。正常张应变能够维持 ECs 正常的表现, 抑制 ECs 凋亡<sup>[3]</sup>, 并促进 ECs 存活与管状结构生成<sup>[4]</sup>; 而高张应变条件下, ECs 的这些功能会发生紊乱, 从而诱导血管重建。

研究表明, 在高血压和动脉粥样硬化等心血管疾病发病过程中, ECs 表面蛋白如细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 等表达上调<sup>[5]</sup>, 诱导血管组织局部炎症反应, 从而参与血管重建。然而, 异常增高的周期性张应变调控的血管炎性因子——肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ ) 对 EMPs 产生及其表面蛋白 ICAM-1 表达的作用尚不清楚。

本课题组首先检测不同幅度周期性张应变对 TNF- $\alpha$  表达的作用。在此基础上, 以 TNF- $\alpha$  刺激 ECs 产生的 EMPs 作为研究对象, 建立 EMPs 提取鉴定方法, 观察 EMPs 数量与表面 ICAM-1 表达的变化, 为后续从 EMPs 的角度探讨血管重建力学生物学机制奠定方法学基础和新的实验证据。

## 1 材料和方法

### 1.1 内皮细胞培养与鉴定

采用酶消化法原代培养大鼠胸主动脉 ECs<sup>[6]</sup>。使用血管性血友病因子 (von Willebrand factor, vWF) 抗体 (1:200, Dako 公司) 对 ECs 胞浆内 vWF

进行免疫荧光染色, 阳性率大于 95% 的 ECs 用于后续实验。

### 1.2 周期性张应变加载<sup>[7]</sup>

选用 2 ~ 4 代 ECs, 按照  $3 \times 10^5$ /孔的密度种植在 Flexercell 6 孔培养板中。当 ECs 达到 80% 左右融合度时, 用 M199 基础培养液同步化细胞 24 h, 并应用 FX-4000T 细胞张应变加载系统对 ECs 分别施加不同拉伸幅度 (5%、18%) 的周期性张应变 24 h, 频率均为 1.25 Hz。

### 1.3 TNF- $\alpha$ 刺激内皮细胞

2 ~ 4 代 ECs 按照  $2 \times 10^5$ /孔的密度种植于 6 孔板中。当 ECs 达到 80% 左右融合度时, 用 M199 基础培养液同步化细胞 24 h。10  $\mu\text{g/L}$  TNF- $\alpha$  刺激 ECs 12 或 24 h。收集培养液提取 EMPs。对照组加入等体积无菌去离子水。

### 1.4 内皮源性微体提取、冻存与复苏

**1.4.1 收集细胞培养液** 收集 ECs 培养液置于 50 mL 的超速离心管中, 3 000  $g$ 、4  $^\circ\text{C}$  离心 30 min, 去除细胞碎片。收集离心后的上清, 20 100  $g$ 、4  $^\circ\text{C}$  离心 90 min, 离心后去除上清得到 EMPs 沉淀。

**1.4.2 EMPs 冻存<sup>[8]</sup>** 将收集得到的 EMPs 快速放到液氮中 20 ~ 30 s, 随即立刻放入 -80  $^\circ\text{C}$  的冰箱中长期储存。取用时将冻存管立刻放置于 37  $^\circ\text{C}$  水浴锅中进行复苏。

### 1.5 内皮源性微体膜染色、透射电镜及 Annexin V 染色鉴定

**1.5.1 EMPs 膜染色鉴定** 100  $\mu\text{L}$  浓度为 5  $\text{mg/L}$  的亲脂性苯乙烯基 (lipophilic styryl) 染色工作液中重悬 EMPs, 放置冰上染色 1 min。染色后的 EMPs 溶液滴到载玻片上, 即刻在荧光显微镜下拍照观察。

**1.5.2 透射电镜鉴定<sup>[8]</sup>** ① 1.5% 戊二醛中固定 12 h, 20 100  $g$  离心 90 min; ② 0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液 (PB) 重悬清洗 EMPs, 离心去除上清, 重复清洗 3 次; ③ 明胶固定后将明胶块切成 1 mm 薄片放入

戊二醛 12 h;④ 0.1 mol/L PB, 4 °C 漂洗 3 次, 每次 15 min;⑤ 将 PB 吸干净, 加入等体积 1% 锇酸, 4 °C 孵育 1 h;⑥ 吸去锇酸, PB 漂洗 3 次, 每次 15 min;⑦ 吸去 0.1 mol/L PB, 加入等体积 50% 乙醇, 4 °C 放置 10 min, 加入 2% 醋酸铀, 4 °C 放置 1.5 h;⑧ 吸去醋酸铀, 依次加入 70%、90% 乙醇和 90% 乙醇/90% 丙酮混合液 (1:1), 4 °C 逐级脱水, 之后加入 2 mL 的 100% 丙酮室温 10 min;⑨ 环氧树脂与丙酮按照 1:1 混合, 室温 1 h。吸去后按 2:1 再次加入, 摇床过夜。约 12 h 后换成纯树脂液, 3 h 后再置换 1 次。4 h 后将样品与纯树脂混合液倒入固定器上, 60 °C 烘箱 48 h;⑩ 切片、电镜拍照。

**1.5.3 Annexin V 染色鉴定**<sup>[9]</sup> 将 20  $\mu$ L EMPs 重悬液加入到 100  $\mu$ L 含钙离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 的 Annexin V-FITC 染色液, 轻弹管底充分混匀, 避光置于室温染色结合 15 ~ 20 min, 即刻进行流式测定。由于 Annexin V 的结合需要  $\text{Ca}^{2+}$ , 故以不含  $\text{Ca}^{2+}$  的 Annexin V-FITC 染色液作为对照组<sup>[9]</sup>。

## 1.6 内皮源性微体染色计数与表面 ICAM-1 表达量检测

**1.6.1 染色计数**<sup>[9]</sup> Annexin V 染色后的 EMPs 悬液中加入直径为 2.5  $\mu$ m 的尼罗红荧光微球 (Nile red fluorescent particles) (1:10 000) 作为内参, 应用流式细胞仪进行相对计数。

**1.6.2 ICAM-1 表达量测定**<sup>[9]</sup> Annexin V 染色后的 EMPs 悬液中加入 4  $\mu$ L 的 ICAM-1-PE, 室温避光孵育 30 min, 20 100 g 离心 30 min, PBS 清洗 1 遍后离心得到 Annexin V/ICAM-1 双荧光标记 EMPs, 流式细胞仪检测 EMPs 的 ICAM-1 表达量。以 ICAM-1 蛋白的同型抗体染色作为阴性对照。

## 1.7 不同张应变条件 TNF- $\alpha$ mRNA 表达量测定

采用荧光定量 PCR 检测 ECs 的 TNF- $\alpha$  mRNA 表达量。TNF- $\alpha$  引物序列如下:

正向引物

3'-GCTC CCTC TCAT CAGT TCCA-5'

反向引物

3'-GCTT GGTG GTTT GCTA CGAC-5'

以 GAPDH 管家基因为内参。PCR 反应具体程序如下: 95 °C 预变性 1 min; 95 °C 变性 30 s, 61 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 30 个循环。

TNF- $\alpha$  PCR 扩增产物送至生工生物工程(上

海)股份有限公司进行 Sanger 测序。经美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 比对确定该段 DNA 序列为大鼠的 TNF- $\alpha$  mRNA, 且位于编码区 (CDS) 区域。

## 1.8 统计学分析

所得结果采用均数  $\pm$  标准差形式表示。当数据服从正态分布, 采用 *t*-test 双尾检验比较 2 组数据间的统计学差异; 当不服从时, 采用 Wilcoxon 秩和检验。所有实验均重复 3 次及以上,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同张应变条件下 ECs 的 TNF- $\alpha$ 表达

应用 Flexercell 细胞张应变加载系统对大鼠胸主动脉 ECs 分别施加 5% (模拟正常生理状态) 和 18% (模拟高血压状态) 幅度的周期性张应变, 在 TNF- $\alpha$  PCR 产物测序结果一致的基础上, 检测不同幅度张应变加载对 ECs 的 TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平的影响。结果显示, 与 5% 张应变相比, 18% 高张应变条件下 TNF- $\alpha$  mRNA 水平显著上升, 说明高张应变明显促进了 ECs 的 TNF- $\alpha$  表达 (见图 1)。

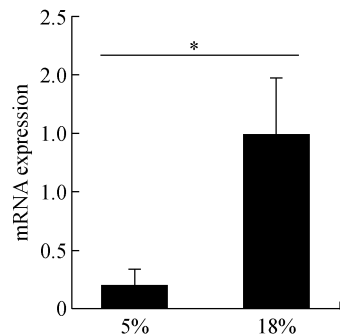


图 1 不同张应变条件下 TNF- $\alpha$  mRNA 表达变化 ( $n=3$ , \*  $P < 0.05$ )

Fig. 1 TNF- $\alpha$  mRNA expression changes under different cyclic strain

### 2.2 ECs 产生 EMPs 的鉴定

**2.2.1 EMPs 膜特异性染色鉴定** 应用亲脂性苯乙烯基与脂质双分子膜特异性结合的原理对 ECs 所产生的 EMPs 进行染色拍照鉴定。结果显示, 低倍镜下 EMPs 呈红色荧光, 即提取的 EMPs 呈亲脂性苯乙烯基染色阳性 [见图 2(a)]。100 倍油镜下可以看到 EMPs 膜结构着色明显 [见图 2(b)]。该结果初步展示了 EMPs 的结构。

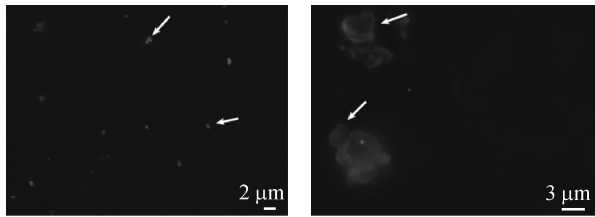


图2 EMPs经亲脂性苯乙烯基染色结果  
Fig. 2 Lipophilic styryl staining results of EMPs

**2.2.2 透射电镜鉴定** 应用透射电镜拍照对提取到的EMP进行形态观察(见图3)。通过标尺定量分析提取到的EMP,其直径为 $0.1 \sim 1 \mu\text{m}$ ,符合EMP大小特性。由于明胶包被等原因,可能使EMP膜结构受到一定的损伤。该结果进一步证明了本研究中EMP提取方法的可行性。

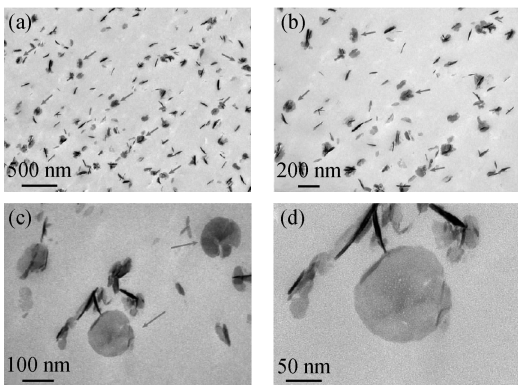


图3 透射电镜下EMP的结构 (a)放大23 000倍,(b)放大49 000倍,(c)放大120 000倍,(d)放大250 000倍

Fig. 3 EMPs identified by transmission electron microscope  
(a) Magnification  $\times 23\ 000$ , (b) Magnification  $\times 49\ 000$ ,  
(c) Magnification  $\times 120\ 000$ , (d) Magnification  $\times 250\ 000$

**2.2.3 Annexin V 染色鉴定** EMP产生过程中表面具有磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS),根据PS与Annexin V特异性结合原理,对提取到的EMP进行Annexin V染色鉴定。首先采用直径为 $1.1 \mu\text{m}$ 的乳胶微球(Latex beads)对EMP大小进行定位,门框1(region 1, R1)中的聚群团为 $1.1 \mu\text{m}$ 的乳胶微球,门框2(region 2, R2)中的聚群团为 $2.5 \mu\text{m}$ 的荧光微球。由于EMP的直径小于 $1.1 \mu\text{m}$ ,故以 $1.1 \mu\text{m}$ 乳胶微球的聚群便可画出流式检测EMP的门,即门框3(region 3, R3)(见图4)。

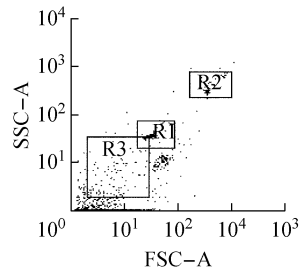
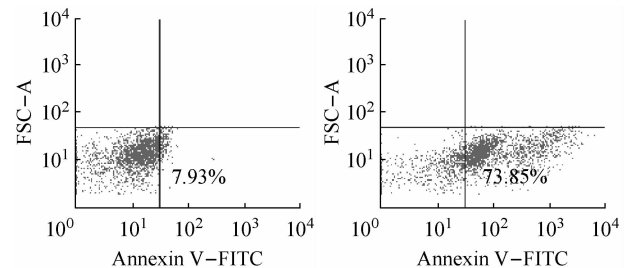


图4 流式细胞仪确定EMP检测范围  
Fig. 4 EMPs detecting region determined by flow cytometry

由于Annexin V与PS结合需要 $\text{Ca}^{2+}$ 存在,故采用无 $\text{Ca}^{2+}$ 的染色液作为对照。散点图显示有无 $\text{Ca}^{2+}$ 染色条件下EMP都出现了很好的聚团;无 $\text{Ca}^{2+}$ 对照组Annexin V染色阳性率为7.93% [见图5(a)],有 $\text{Ca}^{2+}$ 条件下Annexin V染色效率达到73.5% [见图5(b)]。上述结果表明,本实验中提取到的大部分EMP表面具有PS,符合EMP表面具有PS这一特性。该结果也再次证明本研究中EMP提取方法的可行性。

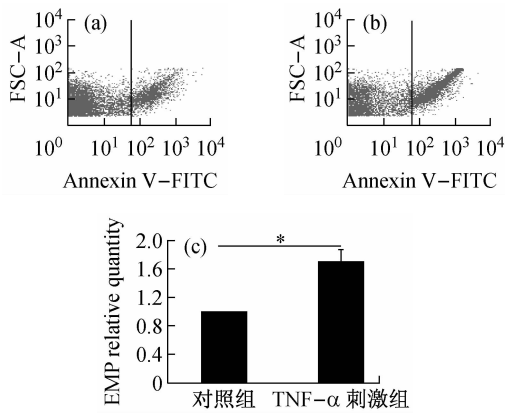


(a) 无 $\text{Ca}^{2+}$ 存在条件 (b) 有 $\text{Ca}^{2+}$ 存在条件

图5 EMPs经Annexin V-FITC染色鉴定散点图  
Fig. 5 Scatter diagram of EMPs identified by Annexin V-FITC staining (a) Without calcium, (b) With calcium

### 2.3 TNF- $\alpha$ 作用于内皮细胞产生EMP数量变化

由于18%病理性高张应变明显促进了ECs的TNF- $\alpha$ 表达,故应用TNF- $\alpha$ 静态刺激实验,探讨增加的TNF- $\alpha$ 对EMP产生及表面分子的作用。采用直径为 $2.5 \mu\text{m}$ 的尼罗红荧光微球(1:10 000)作为内标,每组实验都以采集100个 $2.5 \mu\text{m}$ 尼罗红荧光微球作为参照,从而对ECs所产生的Annexin V阳性EMP进行相对计数。结果显示,与无TNF- $\alpha$ 对照组相比,TNF- $\alpha$ 刺激条件下产生的Annexin V阳性EMP数量显著上升(见图6)。



**图 6** TNF- $\alpha$  刺激 ECs 所产生的 Annexin V 阳性 EMPs 数量变化  
(a) 对照组 (无 TNF- $\alpha$ ) EMPs 的 Annexin V-FITC 染色散点图,  
(b) TNF- $\alpha$  刺激组 EMPs 的 Annexin V-FITC 染色散点图,  
(c) TNF- $\alpha$  刺激组 ECs 产生的 Annexin V 阳性 EMPs 数量显著上升 ( $n=3$ , \*  $P < 0.05$ )

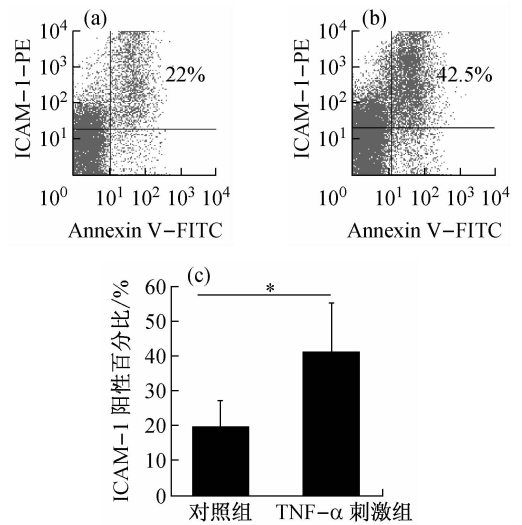
**Fig. 6** Quantity changes of Annexin V positive EMPs in ECs under TNF- $\alpha$  stimulation (a) Scatter diagram of EMPs without TNF- $\alpha$  stimulation identified by Annexin V-FITC staining (control group), (b) Scatter diagram of EMPs under TNF- $\alpha$  stimulation identified by Annexin V-FITC staining (TNF- $\alpha$  stimulation group), (c) Annexin V positive EMPs in ECs increased significantly in TNF- $\alpha$  stimulation group

## 2.4 TNF- $\alpha$ 刺激内皮细胞所产生内皮源性微体表面 ICAM-1 表达变化

应用 Annexin V-FITC 与 ICAM-1-PE 对 EMPs 进行双荧光染色,流式细胞仪检测分析。TNF- $\alpha$  刺激下 ECs 所产生的 EMPs 表面 ICAM-1 阳性百分比 (散点图右上象限) 为 42.5%,与对照组 (22.0%) 相比显著上升 (见图 7),表明 TNF- $\alpha$  刺激下 ECs 产生的 EMPs 能够高表达 ICAM-1,提示 EMPs 可能作为 ICAM-1 的载体进行细胞间信息的传递。

## 3 讨论

早期研究认为,微体 (microparticles, MPs) 是细胞产生的无功能碎片。近年来研究表明,多种细胞来源的 MPs 均具有在细胞间交换生物信息的功能<sup>[10]</sup>,通过转移 MPs 表面蛋白、表面脂质、内部蛋白、mRNA、microRNA,调控靶细胞的功能。MPs 的生物功能与其来源细胞的状态以及所携带的内含物具有密切关系<sup>[11]</sup>。体内和体外研究均表明,EMPs 作为 ECs 来源的 MPs,其数量在多种病理条件下显



**图 7** TNF- $\alpha$  刺激条件下 EMPs 表面 ICAM-1 阳性百分比变化  
(a) 对照组 (无 TNF- $\alpha$ ) EMPs 双染色散点图, (b) TNF- $\alpha$  刺激组 EMPs 双染色散点图, (c) TNF- $\alpha$  刺激组 EMPs 表面 ICAM-1 阳性百分比显著上升 ( $n=3$ , \*  $P < 0.05$ )

**Fig. 7** Changes in percentage of positive ICAM-1 in Annexin V positive EMPs under TNF- $\alpha$  stimulation (a) Scatter diagram of EMPs without TNF- $\alpha$  stimulation identified by ICAM-1-PE and Annexin V-FITC double staining (control group), (b) Scatter diagram of EMPs under TNF- $\alpha$  stimulation identified by ICAM-1-PE and Annexin V-FITC double staining of EMPs (TNF- $\alpha$  stimulation group), (c) The percentage of positive ICAM-1 in Annexin V positive EMPs significantly increased in TNF- $\alpha$  stimulation group

著增加<sup>[12-13]</sup>。因此,EMPs 在细胞间生物信息传递以及心血管疾病发病过程中的作用逐渐引起重视。本研究首先检测模拟高血压状态的高周期性高张应变对 ECs 的 TNF- $\alpha$  表达的作用,结果显示周期性高张应变显著上调 ECs 的 TNF- $\alpha$  表达。之后探讨增加的 TNF- $\alpha$  对 ECs 产生 EMPs 数量及表面 ICAM-1 表达的影响。本研究建立了 EMPs 提取、鉴定方法,为今后从 EMPs 角度深入研究血管重建力学生物学机制奠定基础。

在应用离心法体外提取细胞培养液中 EMPs 的参数选择上,不同实验室使用的离心力大小以及时间目前并无统一标准。有研究报道,提取 EMPs 要施加大于 20 000  $g$  离心力,作用 30 min<sup>[11]</sup>;也有实验室采用 100 000  $g$  离心 90 min<sup>[14]</sup>,或者 20 500  $g$  离心 90 min<sup>[15]</sup>,100 000  $g$  离心 1 h<sup>[8]</sup>等提取 EMPs。本课题组根据本实验室培养液的密度进行离心力与

离心时间的选择。经过亲脂性苯乙烯基膜染色、透射电镜以及流式细胞仪对上述离心条件下获取的 EMPs 进行鉴定,结果证实采用 20 100  $g$ 、4  $^{\circ}C$  离心 90 min 的方法可将 50 mL 培养液中 EMPs 成功沉淀提取。

血液中 MPs 来源广泛,包括血小板源性微体 (platelet microparticles, PMPs)、白细胞源性微体 (leukocytic microparticles, LMPs)、EMPs<sup>[12]</sup> 等。它们结构相似,能够随着血液循环而分布到全身。血液中不同 MPs 可通过不同抗体组合染色进行来源鉴定:EMPs 鉴定标记为血小板内皮细胞黏附分子-1<sup>+</sup>/CD41<sup>-</sup>或 CD144<sup>+</sup>, PMPs 为 PECAM-1<sup>+</sup>/CD41<sup>+</sup>, LMPs 则为 CD45<sup>+</sup><sup>[16]</sup>。根据这些表面蛋白可对血液中不同细胞来源的 MPs 进行分类与计数。而体外培养 ECs 产生的 EMPs,由于 MPs 来源的单一性,可采用磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS)<sup>[17]</sup> 对其进行计数。研究表明,细胞处于激活或凋亡状态下,细胞表面都会出现 PS 外翻现象,同样这种特性也出现在它们所产生的 MPs 上<sup>[18]</sup>。本研究通过与 PS 特异性结合的 Annexin V 染色,对 ECs 产生的 EMPs 进行计数,结果显示 TNF- $\alpha$  刺激 ECs 产生 Annexin V 阳性的 EMPs,并诱导其表面 ICAM-1 的高表达。

ICAM-1 是免疫球蛋白超家族中的一员,是由 ICAM-1 基因表达的一种细胞表面糖蛋白<sup>[19]</sup>。ICAM-1 主要分布于 ECs 以及免疫相关的细胞中。正常状态下 ECs 表面分布少量的 ICAM-1 分子,而 ECs 在白介素-1 (interleukin-1, IL-1) 或 TNF- $\alpha$  刺激下能够大量表达 ICAM-1 分子<sup>[20]</sup>,招募血液中的白细胞,从而介导白细胞穿过 ECs 层进入血管中膜,诱发血管炎症反应以及动脉粥样硬化的发生<sup>[15]</sup>。TNF- $\alpha$  通过激活转录因子 NF- $\kappa$ B,诱导 ECs 形态变化以及黏附分子如 ICAM-1 的表达<sup>[21]</sup>。本研究结果显示,18% 高张应变条件下 ECs 的 TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平约为 5% 正常张应变条件下的 7 倍。在此基础上,应用 TNF- $\alpha$  刺激 ECs,结果表明 TNF- $\alpha$  刺激 ECs 产生 EMPs 数量增加,且其表面高表达 ICAM-1。本研究结果提示,高张应变可能通过诱导 ECs 高表达 TNF- $\alpha$ ,从而促进 EMPs 产生和表面 ICAM-1 的高表达。然而,EMPs 是否能够将高表达的 ICAM-1 转移到靶细胞以协助白细胞进行 ECs 层穿越的发生,

不同浓度 TNF- $\alpha$  以及 TNF- $\alpha$  和周期性张应变的协同作用对 EMPs 数量和表面 ICAM-1 表达有何影响,上述问题均有待于更为深入的研究。

综上所述,本研究成功建立了 EMPs 的提取方法,明确了高张应变作用下 ECs 高表达 TNF- $\alpha$ ,而 TNF- $\alpha$  刺激下 ECs 产生 EMPs 数量与表面 ICAM-1 分子表达均显著增加。上述结果为后续以 EMPs 为切入点探讨力学因素诱导血管重建的分子机制研究提供新的实验证据。

## 参考文献:

- [1] Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(1): 27-33.
- [2] Williams B. Mechanical influences on vascular smooth muscle cell function [J]. *J Hypertens*, 1998, 16(12): 1921-1929.
- [3] Liu XM, Ensenat D, Wang H, *et al*. Physiologic cyclic stretch inhibits apoptosis in vascular endothelium [J]. *FEBS Lett*, 2003, 541(1): 52-56.
- [4] Kou B, Zhang J, Singer DR. Effects of cyclic strain on endothelial cell apoptosis and tubulogenesis are dependent on ROS production via NAD(P)H subunit p22phox [J]. *Microvasc Res*, 2009, 77(2): 125-133.
- [5] Fotis L, Agrogiannis G, Vlachos IS, *et al*. Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 at the early stages of atherosclerosis in a rat model [J]. *In Vivo*, 2012, 26(2): 243-250.
- [6] Kwan HY, Leung PC, Huang Y, *et al*. Depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores sensitizes the flow-induced Ca<sup>2+</sup> influx in rat endothelial cells [J]. *Circ Res*, 2003, 92(3): 286-292.
- [7] 顾翔, 姜隽, 吴垒磊, 等. FOXO1 参与高血压条件下异常张应变诱导的血管平滑肌细胞增殖 [J]. *医用生物力学*, 2014, 29(5): 440-446.  
Gu X, Jiang J, Wu BL, *et al*. The role of FOXO1 in cyclic stretch induced-proliferation of vascular smooth muscle cells during hypertension [J]. *J Med Biomech*, 2014, 29(5): 440-446.
- [8] Philippova M, Suter Y, Toggweiler S, *et al*. T-cadherin is present on endothelial microparticles and is elevated in plasma in early atherosclerosis [J]. *Eur Heart J*, 2011, 32(6): 760-771.
- [9] Jansen F, Yang X, Hoyer FF, *et al*. Endothelial microparticle uptake in target cells is annexin I/phosphatidylserine

- receptor dependent and prevents apoptosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(8): 1925-1935.
- [10] Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, *et al.* Membrane-derived microvesicles: Important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication [J]. *Leukemia*, 2006, 20(9): 1487-1495.
- [11] Mause SF, Weber C. Microparticles: Protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange [J]. *Circ Res*, 2010, 107(9): 1047-1057.
- [12] Faure V, Dou L, Sabatier F, *et al.* Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure [J]. *J Thromb Haemost*, 2006, 4(3): 566-573.
- [13] Boulanger CM, Amabile N, Guerin AP, *et al.* In vivo shear stress determines circulating levels of endothelial microparticles in end-stage renal disease [J]. *Hypertension*, 2007, 49(4): 902-908.
- [14] Combes V, Simon AC, Grau GE, *et al.* In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant [J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(1): 93-102.
- [15] Rautou PE, Leroyer AS, Ramkhalawon B, *et al.* Microparticles from human atherosclerotic plaques promote endothelial ICAM-1-dependent monocyte adhesion and transendothelial migration [J]. *Circ Res*, 2011, 108(3): 335-343.
- [16] Morel O, Jesel L, Freyssinet JM, *et al.* Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(1): 15-26.
- [17] Vion AC, Ramkhalawon B, Loyer X, *et al.* Shear stress regulates endothelial microparticle release [J]. *Circ Res*, 2013, 112(10): 1323-1333.
- [18] Zwaal R, Comfurius P, Bevers E. Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(9): 971-988.
- [19] Carlson M, Nakamura Y, Payson R, *et al.* Isolation and mapping of a polymorphic DNA sequence (pMCT108.2) on chromosome 18 [D18S24] [J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(9): 4188-4188.
- [20] Yang L, Froio RM, Sciuto TE, *et al.* ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF- $\alpha$ -activated vascular endothelium under flow [J]. *Blood*, 2005, 106(2): 584-592.
- [21] Krunkosky TM, Fischer BM, Martin LD, *et al.* Effects of TNF- $\alpha$  on expression of ICAM-1 in human airway epithelial cells in vitro: Signaling pathways controlling surface and gene expression [J]. *Am J Resp Cell Mol*, 2000, 22(6): 685-692.

## 《医用生物力学》杂志征稿、征订启事

《医用生物力学》杂志由中华人民共和国教育部主管、上海交通大学主办,是国内唯一一本公开发行的,以积极反映生物力学基础研究与应用研究成果,推动国内外学术交流,促进医、生、理、工各学科相互了解和合作为目的的学术性刊物。报道内容主要包括生物力学领域中有关力学生物学、器官-组织生物力学、细胞-亚细胞-分子生物力学、感觉系统生物力学、骨骼肌肉系统生物力学、航空航天生物力学、颌面口腔生物力学、呼吸系统生物力学、康复工程生物力学、心血管系统生物力学、血液流变学、医用材料生物力学、运动医学生物力学等的研究论文。本刊为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊);美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、荷兰《文摘与引文数据库》来源期刊;2015年入选北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》(2014年版)。

本刊为双月刊,每双月25日出版,16开本,96页,国内统一连续出版物号CN 31-1624/R,国际标准连续出版物号ISSN 1004-7220;定价每期15.00元,全年90.00元,由邮局向全国征订发行,邮发代号4-633。读者可在附近邮局订阅或通过邮政“11185”客户服务中心电话订阅。欢迎广大读者、作者订阅本刊,踊跃来稿。

地址:上海市制造局路639号200011

电话:(021)53315397;传真:(021)63137020;电子信箱:shengwulixue@163.com

网址:www.medbiomechanics.com, www.mechanobiology.cn