

抗体催化水的氧化对大鼠血管平滑肌细胞 过氧化损伤作用^{*}

彭克军¹ 李丹¹ 孟尧¹ 邓峰美²

(成都医学院 1. 检验医学院; 2. 基础医学院, 四川 成都 610500)

【摘要】 目的 通过观察抗体催化水的氧化作用对大鼠血管平滑肌细胞(VSMCs)的过氧化损伤,探讨其在动脉粥样硬化致病过程中的作用和机制。**方法** 体外分离培养大鼠 VSMCs,随机分为 4 组:空白组、中性粒细胞(Neu)+IgG 组、Neu+PMA 组、Neu+PMA+IgG 组。以佛波酯(PMA)激活大鼠中性粒细胞产生单线态氧($^1\text{O}_2$),促进抗体发挥催化水的氧化作用;采用台盼蓝法检测 VSMCs 的死亡率,CCK-8 法检测 VSMCs 的增殖能力,实时荧光定量 PCR 及免疫组化法检测细胞内增殖细胞核抗原(PCNA)的表达水平,丙二醛(MDA)法检测细胞内脂质过氧化产物。**结果** VSMCs 在培养过程中,当与中性粒细胞和 PMA 共同孵育时,细胞的死亡率、增殖能力、细胞内 PCNA 的表达水平及胞内脂质过氧化产物均显著增高,但增加大鼠 IgG 共同孵育后,其增高水平得到更进一步增强。**结论** 抗体催化水的氧化可能参与了血管平滑肌细胞的过氧化损伤作用。

【关键词】 抗体催化水的氧化;动脉粥样硬化;平滑肌细胞;过氧化损伤

【中图分类号】 R446.6;R541.4 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2023.03.005

Effect of antibody-catalyzed water oxidation on peroxidation damage of vascular smooth muscle cells in rats

PENG Kejun¹, LI Dan¹, MENG Yao¹, DENG Fengmei²

(1. School of Laboratory Medicine, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China;

2. School of Basic Medical Sciences, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China)

【Abstract】 Objective To investigate the role and mechanism of antibody-catalyzed water oxidation in the pathogenesis of atherosclerosis by observing its peroxidation damage of vascular smooth muscle cells (VSMCs) in rats. **Methods** The rat VSMCs were isolated and cultured in vitro, and the rat neutrophils were activated by phorbol ester (PMA) to produce singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) promoting antibody to play a catalytic role in the oxidation of water. The mortality and proliferation of VSMCs were evaluated via trypan blue and CCK-8, respectively. The intracellular expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was measured with quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and immunohistochemistry, and the lipid peroxidation product was determined using malondialdehyde (MDA) method, respectively. **Results** When VSMCs were incubated with neutrophils and PMA, the mortality and proliferation of VSMCs, the cell mortality, proliferation ability, intracellular PCNA expression level and lipid peroxidation products were significantly increased, and its level of increase was further enhanced by the co-incubation of IgG. **Conclusion** The antibody-catalyzed water oxidation may be involved in the oxidative damage of vascular smooth muscle cells.

【Key words】 Antibody-catalyzed water oxidation; Atherosclerosis; Vascular smooth muscle cells; Oxidative damage

基金项目:四川省科技厅重点研发项目(2019YFS0307);四川省教育厅重点项目(15ZA0269)

通讯作者:邓峰美, E-mail: dengfm2004@163.com

引用本文:彭克军,李丹,孟尧,等.抗体催化水的氧化对大鼠血管平滑肌细胞过氧化损伤作用[J].西部医学,2023,35(3):336-340. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3511.2023.03.005

研究发现,抗体除了经典的免疫功能外,还具有一种新的功能,即所有的免疫球蛋白,能催化单线态氧($^1\text{O}_2$)和水反应生成过氧化氢(H_2O_2)和臭氧(O_3)等活性氧分子。 $^1\text{O}_2$ 通过结合抗体折叠部位内的特殊位点,激发抗体催化水的氧化,其催化效率远远高于

其它非免疫球蛋白^[1-3]。抗体的这种催化水的氧化作用在机体的生理免疫防御中赋予一种新的功能,但也可能具有潜在的病理学意义。动脉粥样硬化症(Atherosclerosis, As)目前已被认定为一种慢性炎症性疾病,其中,血管过氧化损伤是其病程发展中的重要环节^[4]。许多证据表明,抗体催化水的氧化作用可能导致血管过氧化损伤。因为 H_2O_2 和 O_3 均被认为是 As 的重要风险因子^[5],且在 As 患者的动脉粥样斑块中已发现 O_3 的化学信号^[6]。本研究拟在细胞水平上探讨抗体催化水的氧化作用是否对主动脉血管平滑肌细胞(Vascular smooth muscle cells, VSMCs)产生过氧化损伤,以探讨抗体催化水的氧化功能在 As 致病过程中的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 SPF 级雄性 Wistar 大鼠,体重 200~250 g,购自成都达硕生物科技有限公司[许可证号:SCXK(川)2008-24],大鼠外周血中性粒细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司,丙二醛(MDA)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所,DMEM 高糖培养基购自 GIBCO 公司,大鼠 IgG 购自上海羽朵生物科技有限公司,牛血清白蛋白、佛波酯(PMA)购自 Sigma 公司;抗鼠 α -SMA 抗体、鼠抗增殖细胞核抗原(PCNA)抗体、生物素化羊抗鼠 IgG、SABC-Cy3 及 SABC 免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,实时荧光定量 RT-qPCR 试剂盒购自 Toyobo 公司。本实验大鼠的处理符合动物伦理委员会要求,并经医院伦理委员会审核批准。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 VSMCs 的培养及纯度鉴定 采用本实验室建立的方法进行培养大鼠 VSMCs 的培养和纯度鉴定^[7]。取大鼠一只,脱臼处死后取出胸主动脉,刮下内膜,贴块法植入 2%明胶包被的培养瓶中,加入含有 20%胎牛血清及双抗的 DMEM 高糖培养基,置于 5% CO_2 、37℃培养箱中进行培养,待细胞生长接近融合时按 1:3 传代。倒置显微镜下观察细胞形态,并制作细胞爬片,以抗鼠 α -SMA 抗体作为一抗,采用 SABC-Cy3 荧光免疫组织化学法染色技术对培养的 VSMC 进行纯度鉴定。

1.2.2 大鼠中性粒细胞的制备 抽取大鼠静脉血 1 mL,按照试剂盒说明方法,采用密度梯度离心法分离及纯化中性粒细胞。显微镜下观察,瑞氏染色中性粒细胞>90%,台盼蓝染色活细胞>90%为合格。

1.2.3 实验细胞分组 取 5 代 VSMC 细胞按 2×10^5 /mL 的密度接种于培养板中,待细胞约 80%汇合时,换无血清的 DMEM 高糖培养基继续同步化培养

12 h,换液后随机分为 4 组:①中性粒细胞(Neu)+PMA+IgG 组:培养细胞中加入终浓度为 1×10^6 /mL 的中性粒细胞、0.5 μ g/mL 的 PMA、1 mg/mL 的大鼠 IgG。②Neu+PMA 组:在①组的基础上省去 IgG。③Neu+IgG 组:在①组的基础上省去 PMA。④空白组:对细胞没有任何干预。各组继续培养后收集 VSMC 细胞进行以下检测。

1.2.4 台盼蓝法检测 VSMCs 的死亡率 各组细胞培养 7 d 后,收集上清液(含死亡细胞),同时采用 0.25%胰酶消化培养孔里的贴壁细胞,与上清液混合制备成单细胞悬液,取少量细胞悬液与 0.4%台盼蓝溶液以 9:1 混合,轻轻吹打混匀,染色 2~3 min,显微镜下观察,染成蓝色的为死亡细胞,计算细胞死亡率。

1.2.5 CCK-8 法检测 VSMCs 的增殖能力 各组细胞于 96 孔板中培养 48 h 后,弃去上清,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,继续培养 2 h,用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(OD 值)。每组培养大鼠血管平滑肌细胞重复检测 6 次。

1.2.6 免疫组化法检测 VSMCs 中 PCNA 分子的表达 采用本实验室建立的方法^[8],显微镜下计数爬片中细胞核被染成棕黄色的 PCNA 阳性细胞,通过计数 PCNA 阳性细胞的百分比,计算细胞中 PCNA 分子的表达水平。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 检测 VSMCs 内 PCNA 的 mRNA 表达水平 采用本实验室建立的方法^[8],提取各组细胞总 RNA 进行逆转录,参照 GenBank 中靶基因 mRNA 的序列设计引物(β -actin:上游,5-TCGAGCAAGAGATGGCCACT-3,下游,5-CACAGGATTCATATCCCAGG-3;PCNA:上游,5-AGGGCTCCATCCTGAAGAAG-3,下游,5-AGCGGTATGTGTCTGAAGCCT-3),以 PCNA 基因拷贝数与内参 β -actin 基因拷贝数比值,计算 PCNA 基因 mRNA 相对表达量。

1.2.8 VSMCs 内脂质过氧化产物含量检测 各组细胞于 6 孔板中培养 48 h 后,弃去上清,采用橡皮刮收集细胞,PBS 洗涤 3 次,按照 MDA 测定试剂盒说明书方法,加入试剂提取液 0.5 mL,混匀后超声波裂解细胞 1 min,测定硫代巴比妥酸反应产物 MDA,用每毫克蛋白中 MDA 的含量表示细胞内脂质过氧化产物的含量(nmol/mg. pro)。每组培养大鼠血管平滑肌细胞重复检测 6 次。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,各样本检测值以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。定量资料行方差分析(ANOVA)及多样本均数的两两比较(LSD);定性资料行 χ^2 检验分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗体催化水的氧化作用促进 VSMCs 的损伤
VSMCs 培养 7 d 后,与空白组比较,Neu+IgG 组细胞死亡率无显著变化,分别为 7.50%和 8.17%($P>0.05$),但 Neu+PMA 组细胞死亡率显著增高,达到 28.3%,

说明 PMA 刺激了中性粒细胞发生呼吸爆发,产生的活性态氧促进了细胞的损伤。但在 Neu+PMA 基础上,加入了 IgG 后,细胞死亡率进一步增加,达到 47.3%,差异有统计学意义($P<0.05$),说明抗体催化水的氧化作用促进了平滑肌细胞的损伤。见图 1。



图 1 各组 VSMCs 台盼蓝染色(100×)
Figure 1 VSMCs trypan blue staining in each group

2.2 抗体催化水的氧化作用促进 VSMCs 的增殖
VSMCs 培养 48 h 后,与空白组比较,Neu+IgG 组细胞增殖能力无显著变化($P>0.05$),但 Neu+PMA 组细胞增殖能力显著增高($P<0.05$),说明 PMA 刺激了中性粒细胞发生呼吸爆发,产生的活性态氧促进了细胞的增殖。在 Neu+PMA 基础上,加入了 IgG 后,细胞增殖能力进一步增加($P<0.05$),说明抗体催化水的氧化作用增强了平滑肌细胞的增殖能力。见表 1。

2.3 抗体催化水的氧化作用促进 VSMCs 内 PCNA 分子的表达
VSMCs 培养 48 h 后,与空白组比较,Neu+IgG 组 PCNA 阳性细胞数均较少,分别为 48%和 52%,两组无显著差异($P>0.05$),但 Neu+PMA 组 PCNA 阳性细胞数显著增高,达到 67%,说明 PMA 刺激产生的活性态氧促进了细胞 PCNA 的表达。在 Neu+PMA 基础上,加入了 IgG 后,PCNA 阳性细胞数进一步增高到 82%,差异有统计学意义($P<0.05$) (图 2)。表明抗体催化水的氧化作用能显著增强平滑肌细胞内 PCNA 分子的表达水平。同时,各组 VSMCs 培养 12 h 后,细胞内 PCNA 的 mRNA 表达水平亦出现相同的变化趋势(图 3)。表明抗体催化水的氧化作用能显著增强平滑肌细胞内 PCNA 的 mRNA 表达水平。

表 1 各组 CCK-8 法检测的 OD 值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	OD 值
空白组	6	0.48±0.11
Neu+IgG 组	6	0.52±0.10
Neu+PMA 组	6	0.67±0.13 ^①
Neu+PMA+IgG 组	6	0.82±0.17 ^②

注:与空白组比较,① $P<0.05$;与 Neu+PMA 组比较,② $P<0.05$ 。

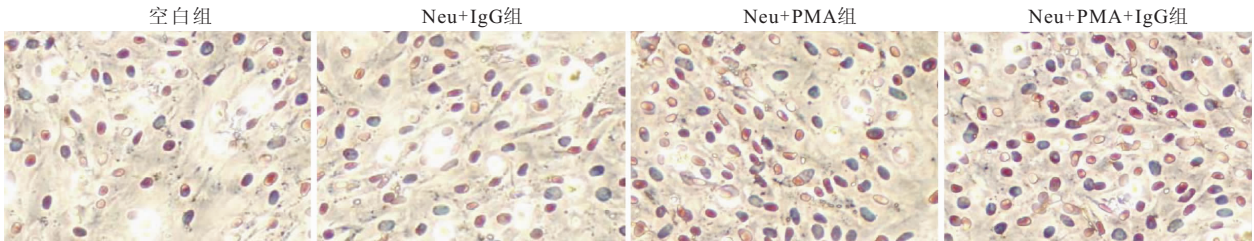


图 2 各组 VSMCs 内 PCNA 分子表达水平(100×)
Figure 2 Expression of PCNA in VSMCs in each group

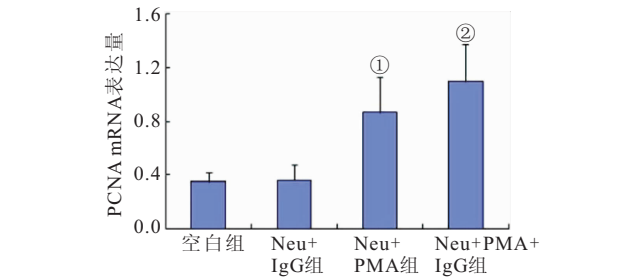


图 3 荧光定量 PCR 检测各组 VSMCs 内 PCNA 的 mRNA 表达水平
Figure 3 mRNA expression of PCNA in VSMCs by qRT-PCR in each group

注:①与空白组比较, $P<0.05$;②与 Neu+PMA 组比较, $P<0.05$ 。

2.4 抗体催化水的氧化作用促进 VSMCs 内脂质过氧化产物生成
VSMCs 培养 48 h 后,与空白组比较,Neu+IgG 组细胞内脂质过氧化产物含量无显著变化($P>0.05$),但 Neu+PMA 组细胞内脂质过氧化产物含量显著增高,说明 PMA 刺激了中性粒细胞发生呼吸爆发,产生的活性态氧促进了细胞内脂质过氧化产物的生成。但在 Neu+PMA 基础上,加入了 IgG 后,细胞内脂质过氧化产物含量进一步增加($P<0.05$),说明抗体催化水的氧化作用促进了平滑肌细胞内脂质过氧化产物的生成。见表 2。

表 2 各组 VSMCs 内脂质过氧化产物含量($\bar{x} \pm s$, nmol/mg·pro)

Table 2 Contents of Lipid Peroxidation products in VSMCs of all groups

组别	n	MDA
空白组	6	0.44±0.09
Neu+IgG 组	6	0.42±0.13
Neu+PMA 组	6	1.95±0.37 ^①
Neu+PMA+IgG 组	6	2.72±0.50 ^②

注:与空白组比较,① $P<0.05$;与 Neu+PMA 组比较,② $P<0.05$ 。

3 讨论

既往研究表明,体内含有以 IgG 为代表的大量免疫球蛋白可促进动脉粥样硬化的形成^[9-11]。例如,自身免疫性疾病患者发生 As 的风险性明显增高^[12-14],患者体内产生的大量抗体,能显著增加低密度脂蛋白过氧化产物和氧化压力^[15-17]。同时大量研究证据显示,抗体催化水的氧化作用可能是脂质过氧化损伤的重要因素。因为机体内激活的单核细胞和中性粒细胞是¹O₂的主要来源,这些吞噬细胞表面均具有 Fc 受体,通过结合免疫球蛋白为抗体催化水的氧化作用提供了可能^[18]。已有报道包被有 IgG 的中性粒细胞或单核细胞激活后能够产生 H₂O₂ 及 O₃ 等活性氧分子的化学信号^[19-20],这些活性氧分子可引起组织的氧化性损伤。

VSMCs 的过氧化损伤是 As 形成和发展过程的重要环节,也是影响粥样斑块发生发展的重要因素之一,可导致大量 VSMCs 在血管内膜中聚积,相继促进结缔组织和新生内膜的形成,进而引起 As^[21]。本研究采用 PMA 激活大鼠分离的中性粒细胞,促使其产生¹O₂,以供抗体催化和水反应生成 H₂O₂ 和 O₃ 等活性氧分子,通过与培养大鼠 VSMCs 共同孵育,以评估 VSMCs 是否发生过氧化损伤。本研究显示,VSMCs 在培养过程中,当与中性粒细胞和 PMA 共同孵育时,细胞的死亡率、增殖能力及胞内脂质过氧化产物生成均显著增高,说明 PMA 刺激了中性粒细胞发生呼吸爆发,产生的¹O₂ 等活性态氧促进了细胞的损伤。但是在中性粒细胞和 PMA 基础上当加入大鼠 IgG 共同培养后,细胞的死亡率、增殖能力及胞内脂质过氧化产物生成等均更进一步显著增强,充分说明抗体催化水的氧化作用促进了平滑肌细胞的过氧化损伤。

本研究同时显示抗体催化水的氧化作用显著增强了平滑肌细胞内 PCNA 蛋白和 mRNA 的表达水平。PCNA 分子与细胞 DNA 的合成关系紧密,在细胞增殖的启动上起重要作用,是反映细胞增殖状态的良好指标^[22]。因此,本研究提示,抗体催化水的氧化作用促进 VSMCs 的增殖能力,可能与其促进细胞内 PCNA 的表达水平有关。

总之,本研究表明抗体催化水的氧化可能参与了

VSMCs 的过氧化损伤作用,为抗体在体内参与 As 的致病过程提供了重要线索,但其具体机制有待于通过体内研究进一步阐明。

4 结论

抗体催化水的氧化作用能显著促进 VSMCs 的死亡率、增殖能力及胞内脂质过氧化产物的生成,其促进 VSMCs 的增殖能力,可能与其促进细胞内 PCNA 的表达水平有关。因此,本研究充分表明抗体催化水的氧化作用促进了平滑肌细胞的过氧化损伤,为抗体在体内参与 As 的致病过程提供了重要线索。

【参考文献】

[1] WELCH M E, RITZERT N L, CHEN H, *et al.* Generalized platform for antibody detection using the antibody catalyzed water oxidation pathway[J]. J Am Chem Soc, 2014, 136(5): 1879-1883.

[2] ONYANGO A N. Alternatives to the 'water oxidation pathway' of biological ozone formation[J]. J Chem Biol, 2015, 9(1): 1-8.

[3] WURTZLER E M, WENDELL D. Selective photocatalytic disinfection by coupling StrepMiniSog to the antibody catalyzed water oxidation pathway[J]. PLoS One, 2016, 11(9): e0162577.

[4] PERROTTA I. Occurrence and characterization of lipofuscin and ceroid in human atherosclerotic plaque [J]. Ultrastruct Pathol, 2018, 42(6): 477-488.

[5] DUGAS T R. Unraveling mechanisms of toxicant-induced oxidative stress in cardiovascular disease[J]. Curr Opin Toxicol, 2018, 7: 1-8.

[6] WENTWORTH P J R, NIEVA J, TAKEUCHI C, *et al.* Evidence for ozone formation in human atherosclerotic arteries[J]. Science, 2003, 302(5647): 1053-1056.

[7] 邢建国,曹文疆,王新春,等. 田蓟苷对 TNF- α 诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖和迁移的影响[J]. 中药药理与临床, 2011, 27(4): 17-20.

[8] XING J, PENG K, CAO W, *et al.* Effects of total flavonoids from Dracocephalum moldavica on the proliferation, migration, and adhesion molecule expression of rat vascular smooth muscle cells induced by TNF-alpha[J]. Pharm Biol, 2013, 51(1): 74-83.

[9] MORIYA J. Critical roles of inflammation in atherosclerosis [J]. J Cardiol, 2019, 73(1): 22-27.

[10] SAGE A P, TSIANTOULAS D, BINDER C J, *et al.* The role of B cells in atherosclerosis[J]. Nat Rev Cardiol, 2019, 16(3): 180-196.

[11] LEY K. Role of the adaptive immune system in atherosclerosis [J]. Biochem Soc Trans, 2020, 48(5): 2273-2281.

[12] ESCÁRCEGA R O, LIPINSKI M J, GARCÍA-CARRASCO M, *et al.* Inflammation and atherosclerosis: Cardiovascular evaluation in patients with autoimmune diseases[J]. Autoimmun Rev, 2018, 17(7): 703-708.

[13] MCMAHON M, SKAGGS B J, SAHAKIAN L, *et al.* High plasma leptin levels confer increased risk of atherosclerosis in

- women with systemic lupus erythematosus, and are associated with inflammatory oxidised lipids[J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(9): 1619-1624.
- [14] WANG Y, YU H, HE J. Role of dyslipidemia in accelerating inflammation, autoimmunity, and atherosclerosis in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases[J]. *Discov Med*, 2020, 30(159): 49-56.
- [15] HASSAN S Z, GHEITA T A, KENAWY S A, *et al*. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients: relationship to disease manifestations and activity[J]. *Int J Rheum Dis*, 2011, 14(4): 325-331.
- [16] SUCIU C F, PRETE M, RUSCITTI P, *et al*. Oxidized low density lipoproteins: The bridge between atherosclerosis and autoimmunity. Possible implications in accelerated atherosclerosis and for immune intervention in autoimmune rheumatic disorders[J]. *Autoimmun Rev*, 2018, 17(4): 366-375.
- [17] SMALLWOOD M J, NISSIM A, KNIGHT A R, *et al*. Oxidative stress in autoimmune rheumatic diseases[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 125: 3-14.
- [18] NIEVA J, WENTWORTH P J R. The antibody-catalyzed water oxidation pathway—a new chemical arm to immune defense? [J]. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29(5): 274-278.
- [19] BABIOR B M, TAKEUCHI C, RUEDI J, *et al*. Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(6): 3031-3034.
- [20] PENG K J, HUANG Y S, AN L N, *et al*. Effect of ozone produced from antibody-catalyzed water oxidation on pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2006, 38(6): 417-422.
- [21] SHAH A, GRAY K, FIGG N, *et al*. Defective base excision repair of oxidative DNA damage in vascular smooth muscle cells promotes atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2018, 138(14): 1446-1462.
- [22] DE MARCH M, DE BIASIO A. The dark side of the ring: role of the DNA sliding surface of PCNA[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2017, 52(6): 663-673.

(收稿日期:2022-05-09;修回日期:2022-12-22;编辑:刘灵敏)

(上接第 335 页)

- [20] CAO N, TANG X, GAO R, *et al*. Galectin-3 participates in PSMC migration and proliferation by interacting with TGF- β 1 [J]. *Life Sci*, 2021, 274: 119347.
- [21] 陈燕伟, 马善波, 张蕊. 血府逐瘀汤联合替莫唑胺对脑胶质瘤大鼠 ERK/MAPK 信号通路的调节作用[J]. *西部医学*, 2021, 33(9): 1258-1263.
- [22] KANG H, TONG C, LI C, *et al*. miR-497 plays a key role in Tanshinone IIA-attenuated proliferation in OCI-AML3 cells via the MAPK/ERK1/2 pathway[J]. *Cytotechnology*, 2020, 72(3): 427-432.
- [23] PAN L, NI H, JIN W, *et al*. Inhibition of ERK or Akt ameliorates intimal hyperplasia via up-regulation of Cx37 and down-regulation of Cx43 in balloon injury rat model[J]. *Cardiovasc Diagn Ther*, 2020, 10(4): 658-666.
- [24] 高栋梁, 张雷, 王亚康, 等. 水蛭素对大鼠缺血皮瓣血管生成的促进作用及机制[J]. *西部医学*, 2020, 32(11): 1584-1588.

(收稿日期:2022-05-26;修回日期:2022-12-13;编辑:刘灵敏)