

家兔腹腔巨噬细胞能产生单核细胞趋化蛋白-1*

王国平 邓仲端 瞿智玲

(同济医科大学病理学教研室, 武汉 430030)

Production of Monocyte Chemoattractant Protein-1 by in Rabbits Peritoneal Exudate Macrophages

WANG Guo-Ping, DENG Zhong-Duan and QU Zhi-Ling

(Department of Pathology, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) is a potent monocyte chemoattractant secreted by many cells. In this study, we examined if rabbit peritoneal exudate macrophages produce MCP-1.

Methods The monocyte migration induced by the media conditioned by cultured rabbit peritoneal exudate macrophages was assayed by micropore filter method using modified Boyden chamber. Influence of anti-MCP-1 antibody on monocyte migration was observed as well. Meanwhile, we examined the expression of MCP-1 mRNA in the macrophages by Northern blot analysis.

Results Cultured rabbit peritoneal exudate macrophages produced a factor that was chemotactic for monocytes, and the activity due to chemotaxis and not chemokinesis, the chemotactic activity was markedly inhibited by anti-MCP-1 antibody. MCP-1 mRNA was expressed by the macrophages.

Conclusions Macrophages can produce MCP-1 and play an important role in atherogenesis through attracting monocytes to migrate into subendothelial space.

KEY WORDS Monocyte chemoattractant protein-1; Migration; Macrophage; Monocyte; Atherosclerosis

osis

摘要 用培养的家兔腹腔巨噬细胞条件培养基作为趋化因子的来源,用改良的 Boyden 小室微孔滤膜法进行单核细胞趋化试验,观察了兔腹腔巨噬细胞条件培养基对单核细胞的趋化作用和抗单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 抗体对单核细胞迁移的影响。同时用 Northern blot 分析方法检测了 MCP-1 mRNA 在该巨噬细胞的表达。结果显示,该条件培养基对单核细胞有明显的趋化作用,并被抗 MCP-1 抗体所抑制。同时该巨噬细胞也能表达 MCP-1 mRNA。这提示,巨噬细胞能分泌 MCP-1,并招引单核细胞迁入内皮下间隙,从而在动脉粥样硬化的发病过程中发挥重要的作用。

关键词 单核细胞趋化蛋白-1; 迁移; 巨噬细胞; 单核细胞; 动脉粥样硬化

在动脉粥样硬化的发生发展过程中,外周血单核细胞(monocyte, MC)迁入内皮下间隙具有极为重要的意义。MC 迁入内膜是受到动脉壁内细胞分泌的 MCP-1 的作用。然而,迁入内膜的 MC,在其分化为巨噬细胞之后,是否亦分泌 MCP-1,参与招引其它血液 MC 迁入内膜的过程? 目前还尚未定论。因此研究巨噬细胞对 MC 迁移的作用,这对于研究动脉粥样硬化的发病机制具有极为重要的意义。作者以兔腹腔巨噬细胞(peritoneal exudate macrophage, PEM)条件培养基作为趋化因子的来源,研究了其对 MC 的趋化作用及 PEM 是否能产生 MCP-1。

1 材料与方法

1.1 兔腹腔巨噬细胞的收集和培养及其条件培养基的制备

* 国家自然科学基金资助项目

取正常日本大耳白兔, 无菌条件下每只兔腹腔注射 3% 可溶性淀粉 150 ml。饲养 4 天后, 用含肝素的 PBS 灌洗腹腔, 收集巨噬细胞^[1]。用含 10% 胎牛血清(Gibco)的 RPMI 1640(Gibco)在 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 2 h, 使之附壁, 然后弃去培养液, 用温 PBS 轻轻清洗 2~3 次, 加入 RPMI 1640(含 50 mg·L⁻¹庆大霉素, 2 mol·L⁻¹谷氨酰胺), 置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养, 细胞密度为 20×10⁴/cm², 培养 24 h 后收集条件培养基。非条件培养基的制备过程同上, 只是培养皿中无 PEM。

1.2 兔血单核细胞的分离及培养

在无菌条件下用淋巴细胞分离液(上海试剂二厂, 每 100 ml 分离液加 60% 泛影葡胺 3.5 ml)分离兔血单个核白细胞, 附壁纯化后获得 MC^[2]。用 RPMI 1640 收集 MC, 置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养, 然后用非条件培养基制备 MC 悬液, 细胞密度为 1×10⁶ 个/L, 用于趋化试验。

1.3 迁移试验

1.3.1 单核细胞迁移试验 用改良的 Boyden 小室进行^[3]。下室加满各种实验液(含或不含趋化物质), 上室加入 MC 悬液, 上下室间隔以硝酸纤维素微孔滤膜

(德国 Schieicher & Schuell 公司), 将小室置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中温育 90 min。取出滤膜, 放入染色铜网中, Harris 苏木素染色。

1.3.2 单核细胞移动距离的检测 在显微镜(物镜×40, 目镜×10)下, 调微调旋钮至焦点对准滤膜表面(可见膜结构和大量 MC)作为起点, 向下转动微调旋钮, 可见细胞数目逐渐减少, 至只有 2~3 个细胞为止, 即为 MC 移动的终点^[2]。从微调平轮的刻度上读出起点到终点的微米数, 即为 MC 移动的距离。每膜随机取 5 个视野, 每组两级膜共 10 个视野, 实验共进行 3 次, 共得 30 个数据, 算出平均数和标准差($\bar{x} \pm s$)。

1.3.3 兔腹腔巨噬细胞条件培养基对单核细胞趋化试验 共分 4 组: (1)随机移动组即阴性对照组, 上下室均为非条件培养基, 以观察 MC 的随机移动; (2)化学促动组, 上下室均为条件培养基, 以观察在上下室无趋化因子的浓度梯度时 MC 的移动; (3)趋化运动组, 上室为非条件培养基, 下室加入 PEM 条件培养基, 以观察其对 MC 是否有趋化活性; (4)阳性对照组, 上室为非条件培养基, 下室加入活化血清, 即正常兔血清经酵母提取物激活而成^[3], 其中含有 C5a, 对 MC 有很强的趋化活性(Table 1)。

Table 1. Grouping in migration assay using modified Boyden chamber.

Group	liquids of MC suspension in upper well	experimental liquids in lower well
random migration	unconditioned media	unconditioned media
chemokinesis	conditioned media	conditioned media
chemotaxis	unconditioned media	conditioned media
positive control	unconditioned media	C5a

1.3.4 抗单核细胞趋化蛋白-1 抗体对单核细胞迁移的影响 在 PEM 的条件培养基中加入抗 MCP-1 抗体(中国军事医学科学院提供), 在 37℃ 下温育 2 h, 然后离心(8 000×g, 1 min)以除去免疫复合物。同时用

活化血清代替条件培养基作对照。共分 6 组: (1)非条件培养基组, (2)非条件培养基+Ab(antibody, Ab)组, (3)条件培养基组, (4)条件培养基+Ab, (5)阳性对照组, (6)阳性对照+Ab 组(Table 2)。

Table 2. The inhibition of anti-MCP-1 antibody on the chemotactic activity of PEM conditioned media.

Group	Liquids of MC suspension in upper chamber	Experimental liquids in lower chamber
UM	unconditioned media	unconditioned media
UM+Ab	Unconditioned media	unconditioned media+antibody
CM	unconditioned media	conditioned media
CM+Ab	unconditioned media	conditioned media+antibody
control	unconditioned media	C5a
control+Ab	unconditioned media	C5a+antibody

1.4 Northern blot 分析

经异硫氰酸胍法^[4]提取的总 RNA 在甲醛和 1% 的琼脂糖凝胶上电泳,然后转移至尼龙膜(Gibco)上。此膜置真空干燥 2 h 后放在预杂交液中在 60℃ 下预杂交 4 h,用 ^{32}P 末端标记 MCP-1 寡核苷酸探针(探针由西安医科大学提供,标记按 Promega 试剂盒进行),将转印好的尼龙膜于杂交液中在 60℃ 下杂交过夜。杂交液由下列物质组成:0.75 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ NaCl, 0.15 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ Tris $\cdot \text{HCl}$, 10 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, 5 \times Denhardt 溶液, 0.1% SDS, 0.1% $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$, 100 mg $\cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 DNA 和 2×10^6 cpm 标记的探针 1 ml,杂交完后用清洗液(0.2 \times SSC 和 0.1% SDS)在 60℃ 下洗膜 4 次,晾干后放入暗盒内在 -70°C 下紧贴感光胶片曝光 72 h。常规显影定影后,用 TJTY-300 型医用图像处理系统检测各样本的积分光密度值,以观察 MCP-1 mRNA 的表达情况。

2 结果

2.1 巨噬细胞条件培养基所致单核细胞迁移

单核细胞的平均移动距离($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)分别为:随机移动组 44.3 ± 2.0 ,化学促动组 47.5 ± 1.6 ,趋化运动组 71.9 ± 2.3 ,阳性对照组 83.8 ± 2.1 。结果表明,趋化运动组和阳性对照组的 MC 移动距离明显大于随机对照组和化学促动组,其差异经统计学处理有极显著性意义($P < 0.01$);随机移动组和化学促动组相比,其差异无显著性意义($P > 0.05$, Table 3)。

Table 3. Monocyte migration distance induced by PEM derived conditioned media($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$).

Group	n	migration distance
random migration	30	$44.3 \pm 2.0^\Delta$
chemokinesis	30	$47.5 \pm 1.6^*$
chemotaxis	30	$71.9 \pm 2.3^{\Delta\Delta}$
positive control	30	83.8 ± 2.1

$\Delta\Delta$ compared with Δ , $P < 0.01$; * compared with Δ , $P > 0.05$.

2.2 抗单核细胞趋化蛋白-1 抗体对单核细胞迁移的影响

单核细胞的平均移动距离($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)分

别为非条件培养基组 44.3 ± 2.0 、非条件培养基+Ab 组 45.7 ± 1.8 、条件培养基组 71.9 ± 2.3 、条件培养基+Ab 组 44.1 ± 1.9 、阳性对照组 83.8 ± 2.1 、阳性对照组+Ab 组 82.6 ± 1.8 。结果表明,抗 MCP-1 抗体本身无趋化作用($P > 0.05$),但它能明显地抑制 PEM 条件培养基所致的 MC 迁移($P < 0.01$),而对由 C5a 所致的 MC 迁移无明显作用($P > 0.05$, Table 4)。

Table 4. The inhibition of anti-MCP-1 antibody on the chemotactic activity of PEM conditioned media.

Group	n	migration distance
UM	30	$44.3 \pm 2.0^*$
UM+Ab	30	$45.7 \pm 1.8^{**}$
CM	30	$71.9 \pm 2.3^\Delta$
CM+Ab	30	$44.1 \pm 1.9^{\Delta\Delta}$
control	30	83.8 ± 2.1
control+Ab	30	82.6 ± 1.8

** compared with * , $P > 0.05$, $\Delta\Delta$ compared with Δ , $P < 0.01$.

2.3 Northern blot 分析

兔腹腔巨噬细胞分别在 $10 \times 10^4/\text{cm}^2$ 和 $20 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的细胞密度下于 37°C 培养 24 h,然后参照异硫氰酸胍法^[4]分别提取细胞总 RNA,进行 Northern blot 分析。结果提示,PEM 能表达 MCP-1 mRNA,并对细胞密度有依赖性趋势(Figure)。

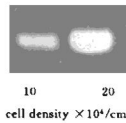


Figure. Expression of MCP-1 mRNA by PEM. PEM were plated at two densities shown on the X axis and incubated for 24 hours at 37°C . RNA was extracted and Northern blot analysis was performed with MCP-1 probe.

3. 讨论

几年来的研究表明^[5,6],MCP-1 是 MC 趋

化因子,它是由 76 个氨基酸残基构成的蛋白单链,是一种碱性蛋白质。它所致的 MC 迁移是趋化作用(chemotaxis)而非化学促动作用(chemokinesis)。然而,它对中性白细胞及嗜酸性白细胞均无趋化作用。

Yla-Herttuala 等^[7]通过原位杂交试验证实,在人和兔富含巨噬细胞的动脉粥样硬化病变区,可检出 MCP-1 mRNA,而在病变下中膜平滑肌或正常动脉壁则否。因而认为,MCP-1 在富含巨噬细胞的动脉粥样硬化区域表达甚为强烈,并且 MCP-1 在 MC 不断地进入病变区过程中起重要作用。有资料表明^[8],MCP-1 能够刺激 MC 并使其胞液游离 Ca^{2+} 浓度升高,而后者是 MC 发生迁移所必需的^[2]。我们的研究表明,PEM 源性的条件培养基能诱导 MC 迁移,这种迁移是一种趋化作用,而非化学促动作用。它提示 PEM 可能分泌一种 MC 趋化因子。用抗 MCP-1 抗体作用于该条件培养基后,能明显地抑制该条件培养基所致的 MC 迁移,提示在 PEM 的条件培养基中有 MCP-1 存在。为了进一步从分子水平上明了 PEM 是否可表达 MCP-1,我们用 Northern blot 分析表明,PEM 能表达 MCP-1 mRNA,其表达与细胞密度有依赖性趋势。

根据上述结果,我们认为,PEM 可能产生 MCP-1 而诱导 MC 迁移。由此可见,在动脉粥样硬化的发病过程中,进入内皮下间隙的 MC 被激活而分化为巨噬细胞后,可通过分泌 MCP-1 不断地诱导其它外周血 MC 迁入内皮

下间隙,从而促进动脉粥样硬化的发生和发展。

参考文献

- 1 邱红明,邓仲端,武忠弼, et al. 巨噬细胞源性生长因子对培养的主动脉平滑肌细胞周期的影响. 中华病理学杂志, 1990, 19(1): 4.
- 2 王国平,邓仲端,李丽珠, et al. 平滑肌细胞源性趋化因子所致单核细胞迁移的钙依赖性研究. 中国动脉硬化杂志, 1994, 2(1): 1~5.
- 3 朱阎宏,王珩,邓仲端, et al. 培养的动脉粥样硬化兔主动脉平滑肌细胞产生单核细胞趋化因子. 中国循环杂志, 1991, 6(3): 216~218.
- 4 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162(1): 156~159.
- 5 Leonard EJ, Yoshimura T, et al. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today*, 1990, 11(3): 97~101.
- 6 Robinson EA, Yoshimura T, Leonard EJ, et al. Complete amino acid sequence of a human monocyte chemoattractant, a putative mediator of cellular immune reactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(6): 1 850~54.
- 7 Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88(11): 5 252~56.
- 8 Rollins BJ, Walz A, Baggiolini MR. Ecombinant human MCP-1/JE induces chemotaxis, calcium flux, and the respiratory burst in human monocytes. *Blood*, 1990, 78(4): 1 112~16.

(本文 1995-10-20 收到)