

• 论著 •

单核细胞趋化蛋白-1 在兔食饵性
动脉粥样硬化病变中的表达

熊力军 邓仲端 王国平 夏春枝 徐增绶

(同济医科大学病理学教研室, 武汉 430030)

Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Dietary Atherosclerotic Lesions in Rabbits

XIONG Li-Jun, DENG Zhong-Duan, WANG Guo-Ping, XIA Chun-Zhi and XU Zeng-Shou

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

ABSTRACT

Aim To understand the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression by the cells in dietary atherosclerotic lesions in rabbits.

Methods The male 4~6 week old Japanese lop rabbits were fed on cholesterol to develop a hyperlipidemia and atherosclerosis model. The MCP-1 mRNA expression in the plaques was examined by dot blot analysis using a probe of γ - ^{32}P -end-labeled 35-mer oligonucleotide of MCP-1. Meanwhile, the MCP-1 in the media conditioned by cultured SMCs from the atherosclerotic lesions was determined by using sandwich ELISA. Immunohistochemically, the expression of MCP-1 in various cells in the plaques was examined using a rabbit anti-MCP-1 polyclonal antibody, and to recognize the cells in the plaques, several antibodies including factor VIII related antigen, α_1 -antitrypsin and α -smooth muscle actin were used.

Results Dot blot analysis showed that after hybridization of the RNA with the probe, the integral optical density value (4.15) of the autoradiographic pictures of the dots from the atherosclerotic lesions was 10.7

times the controls (0.38). The MCP-1 content in the media conditioned by cultured SMCs from the atherosclerotic lesions ($\bar{x} \pm s$, $10.0 \pm 0.8 \mu\text{g/L}$), as the ELISA showed, was significantly higher than that of the normal SMC conditioned media ($7.0 \pm 0.7 \mu\text{g/L}$) and unconditioned medium ($6.4 \pm 0.7 \mu\text{g/L}$) ($P < 0.01$). Immunohistochemically, endothelial cells, macrophage derived foam cells and SMCs in the plaques were positively stained with anti-MCP-1 antibody in varying degrees. Of the three cell types, the macrophage derived foam cells showed the strongest immunostaining.

Conclusion Under hyperlipidemic condition, the artery wall cells which participate in the development of atherosclerotic plaques were in full activity, and produced and secreted MCP-1 in different degrees. The production of MCP-1 mainly by macrophages suggests that they play an important role in the recruitment of additional monocytes to the atherosclerotic plaques.

KEY WORDS Monocyte chemoattractant protein-1; Atherosclerosis; Rabbit

摘要 为了探讨单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 在动脉粥样硬化病变中的表达情况, 以含胆固醇饲料复制家兔高脂血症和动脉粥样硬化模型。用 $\gamma^{32}\text{P}$ 末端标记的单核细胞趋化蛋白-1 寡核苷酸探针检测斑块组织中单核细胞趋化蛋白-1 mRNA 的表达, 夹心酶联免疫吸附法检测培养的斑块平滑肌细胞条件培养基中单核细胞趋化蛋白-1 含量, 免疫组织化学法观察斑块组织细胞中单核细胞趋化蛋白-1 的表达。结果发现, 动脉粥样硬化病变组织表达单核细胞趋化蛋白-1 mRNA 的积分光密度值 (4.15) 为对照组 (0.38) 的 10.7 倍。培养的斑块平滑肌细胞

条件培养基中单核细胞趋化蛋白-1含量($10.0 \pm 0.8 \mu\text{g/L}$)明显高于正常平滑肌细胞条件培养基($7.0 \pm 0.7 \mu\text{g/L}$)和非条件培养基($6.4 \pm 0.7 \mu\text{g/L}$),差异有极显著性意义($P < 0.01$)。免疫组织化学发现,斑块中的内皮细胞、巨噬细胞源泡沫细胞和增殖的平滑肌细胞均不同程度地表达单核细胞趋化蛋白-1,以巨噬细胞源泡沫细胞表达最强。此结果提示在高脂血症时,参与动脉粥样硬化斑块形成的细胞处于相当活跃状态,均能产生和分泌单核细胞趋化蛋白-1。

关键词 单核细胞趋化蛋白1; 动脉粥样硬化; 免

众所周知,外周血单核细胞(monocyte, MC)迁入内皮下间隙是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)病变内泡沫细胞的主要来源。然而,至今MC迁入内膜的机制并未完全清楚。MC的迁移受到多种因素的作用,其中主要的有单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)和巨噬细胞炎性蛋白-1(macrophage inflammatory protein-1, MIP-1)等^[1,2]。体外研究证明,动脉壁细胞,包括内皮细胞^[3]、平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)^[4]及迁入内膜的单核/巨噬细胞^[5,6],均可表达MCP-1 mRNA和蛋白。而且,氧化型低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白均可诱导动脉壁细胞表达高水平的MCP-1 mRNA和蛋白。近年来,国外有报道,人体及家兔As病变中发现MCP-1的表达^[7~9],但国内未见报道。本文以含胆固醇饲料喂家兔,复制高脂血症和As模型后检测了As病变中MCP-1的表达,以阐明MC迁入动脉内膜的机制。

1 材料和方法

1.1 复制动脉粥样硬化模型及提取RNA

取4~6周龄雄性日本大耳白兔12只,平均体重1.2 kg(同济医科大学动物中心提供)。随机分为两组,实验组8只,喂以含1%胆固醇、3%猪油的颗粒饲料,对照组4只,喂以标准颗粒饲料。实验3个月,处死动物,并事先抽血检查血脂。

无菌条件下,取出胸主动脉,在硅胶板上小心剥去外膜结缔组织,将其纵向剪开,平铺于硅胶板上,用帽针固定四角。先用手术刀片作若干横切线,每隔1 cm,深度达中膜2/3,然后用组织剥离镊剥下中膜2/3及内

膜。切成碎块后用匀浆器制成匀浆。参照异硫氰酸胍法提取组织的总RNA^[10]。

1.2 Dot blot 分析

用斑点杂交点样器将总RNA样本点于硝酸纤维素微孔滤膜(Gibco)上,将滤膜置于真空干燥2 h,放入预杂交液中,60℃下预杂交4 h,然后置于含 $\gamma^{32}\text{P}$ 末端标记的MCP-1寡核苷酸探针(由西安医科大学免疫病理研究室合成)的杂交液中杂交18 h。用清洗液($0.2 \times \text{SSC}$ 和0.1% SDS)60℃下洗膜4次。凉干后在-70℃下对感光胶片曝光72 h。经常规显影、定影、水洗、凉干后,用TJTY图像分析系统对斑点进行检测。

1.3 夹心酶联免疫吸附试验

用贴块法培养动脉粥样硬化兔和正常兔主动脉中膜SMC^[4]。传至3~5代,分别收集二者的条件培养基(conditioned medium, CM),以不含细胞的无血清培养液为非条件培养基(unconditioned medium, uCM)。参照Evanoff等^[11]报道的夹心酶联免疫吸附法检测两种培养基中MCP-1含量。兹简述如下。用96孔酶标板,用MCP-1多克隆抗体(中国军事医学科学院提供)包被($50 \mu\text{L}/\text{孔}$, $1:200$),4℃过夜。吸弃包被液,每孔用清洗缓冲液清洗3次。继用小牛血清阻断各孔,37℃ 2 h。清洗3次后,分别加MCP-1标准品(Gibco公司,稀释度 $0.1 \mu\text{g/L}$ 至 $10 \mu\text{g/L}$)和As-SMC-CM、N-SMC-CM及uCM各 $50 \mu\text{L}$,37℃温育2 h。清洗3次后,每孔加 $50 \mu\text{L}$ 抗MCP-1抗体,37℃温育2 h。清洗3次,每孔加 $50 \mu\text{L}$ biotin 标记的抗兔抗体($1:100$, 中山生物技术公司),37℃温育1.5 h。清洗3次,每孔加 avidin-HRP($1:100$),37℃温育1 h。清洗3次,加 $100 \mu\text{L}$ 过氧化物酶底物[0.67 g/L 邻苯基二胺, 25 mmol/L 枸橼酸, pH 5 及 0.0002% (v/v) 过氧化氢],室温下显色6 min,每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 的 3 mol/L H_2SO_4 终止反应。用酶标分析仪测量颜色的吸收率,从MCP-1的标准曲线确定MCP-1的浓度(波长490 nm)。

1.4 免疫组织化学

分别取实验组As斑块和对照组主动脉组织,10%缓冲福尔马林溶液固定,石蜡包埋。作连续切片,分别做以下免疫染色:抗MCP-1多克隆抗体,Ⅷ因子相关抗原(Sigma), α_1 -抗胰蛋白酶(Calbiochem公司)及 α -平滑肌肌动蛋白(Sigma)。采用微波炉抗原修复、二抗用生物素标记羊抗兔IgG, DAB- H_2O_2 底物显色,部分切片用苏木素复染。阴性对照以磷酸缓冲液代替一抗。

2 结果

2.1 主动脉病变和血脂变化

实验组兔胸主动脉有中度至重度 As 病变, 而对照组动脉内膜光滑, 无病变。血脂升高以总胆固醇和低密度脂蛋白最明显, 与对照组相比, 有极显著统计学差异($P<0.01$; 表 1, Table 1)。

Table 1. Plasma lipid levels in cholesterol-fed and control rabbits ($\bar{x}\pm s$, mmol/L).

Groups	n	TC	LDLC
Cholesterol-fed	8	21.7 \pm 5.1 ^b	17.7 \pm 3.8 ^b
Control	4	2.6 \pm 0.6	1.6 \pm 0.7

TC: total cholesterol, LDLC: low density lipoprotein cholesterol. b: $P<0.01$, compared with control group.

2.2 Dot blot 分析

动脉粥样硬化(As)病变组织匀浆的 RNA 与探针杂交后, 放射自显图像经扫描仪检测结果显示, 两个样本的积分光密度值(平均 4.15)明显大于对照组(平均 0.388), 前者为后者的 10.7 倍(图 1 和图 2, Figure 1 and Figure 2)。

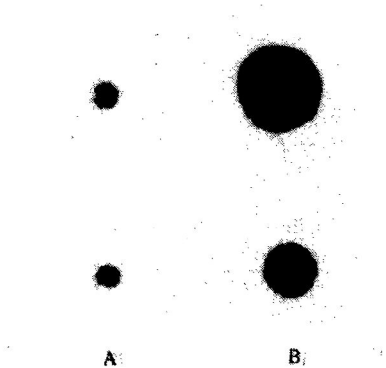


Figure 1. Expression of MCP-1 mRNA in atherosclerotic lesions and normal aortic intima-media. A: normal intima media, B: As lesions.

2.3 平滑肌细胞条件培养基中单核细胞趋化蛋白-1 含量

动脉粥样硬化(As)兔 SMC 条件培养基(As-SMC-CM)和正常兔 SMC 条件培养基(N-

SMC-CM)的 ELISA 检测结果显示, 2 倍浓缩及未浓缩的 As-SMC-CM 中的 MCP-1 蛋白含量明显高于 N-SMC-CM 和 uCM, 差异有非常显著性意义($P<0.01$), 而 N-SMC-CM 与 uCM 相比, 无显著性差异(表 2, Table 2)。

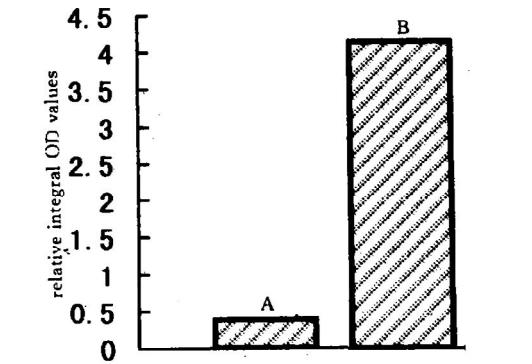


Figure 2. Densitometry scans of the dot blots of MCP-1 mRNA. A: normal intima-media. B: As lesions.

Table 2. MCP-1 protein levels in SMC-CM in As and normal(N) rabbits and in uCM ($\bar{x}\pm s$, $\mu\text{g/L}$)

Groups	n	MCP-1 protein level
As-SMC-CM-1 ^①	6	11.9 \pm 0.9
As-SMC-CM-2 ^②	6	10.0 \pm 0.8
N-SMC-CM	6	7.0 \pm 0.7 ^{ab}
uCM	6	6.4 \pm 0.7 ^{ab}

CM: conditioned medium, uCM: unconditioned medium.
① As-SMC-CM-1 is the 2-fold concentrated As-SMC-CM group. ② As-SMC-CM-2 is the unconcentrated As-SMC-CM group. a: $P<0.01$, compared with As-SMC-CM-1 group. b: $P<0.01$, compared with As-SMC-CM-2 group.

2.4 免疫组织化学

实验组的 As 斑块主要由巨噬细胞源性泡沫细胞构成, 对 α_1 抗胰蛋白酶呈阳性反应, 泡沫细胞内脂质空泡不着染, 而靠近膜的胞浆及胞膜染成棕色。斑块表层及中上层可见一些梭形细胞, 对 α -平滑肌肌动蛋白单克隆抗体呈阳性反应(图 3, Figure 3), 斑块底部增殖的 SMC 及中膜 SMC 均呈阳性反应。斑块表面内皮细胞 VIII 因子相关抗原呈阳性反应。

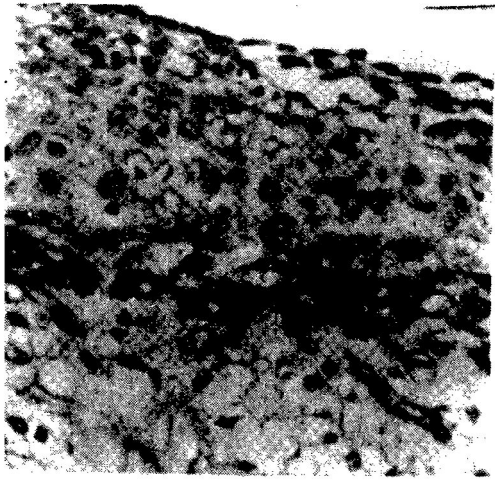


Figure 3. Immunostaining for α -actin. Strong positively stained cells were located in the upper area (↑) of the As plaque (Streptavidin-biotin technique, $\times 227$).

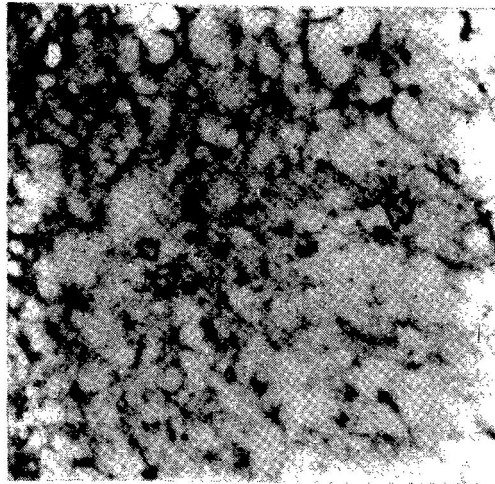


Figure 4. Immunostaining for MCP-1. The macrophage derived foam cells (upper left) and myogenic foam cells (↑) were positively stained with MCP-1 polyclonal antibody (Streptavidinbiotin technique, $\times 227$)

抗 MCP-1 多克隆抗体免疫染色显示, As 斑块表面内皮细胞着色中等, 其下的巨噬细胞源性泡沫细胞的 MCP-1 表达很强, 靠近胞膜的胞浆及胞膜呈棕色, 以致在细胞聚集区呈网状结构。斑块中上层增殖的 SMC 及斑块底部的 SMC 呈弱表达(图 4, Figure 4), 中膜 SMC 呈

弱表达或不表达。对照组主动脉除内皮细胞轻度着染外, 中膜 SMC 呈阴性反应。

3 讨论

单核细胞趋化蛋白(MCP)-1 是一种分泌性肽, 对血液单核细胞有很强的趋化活性, 在招引单核细胞迁入内皮下间隙起重要作用。我们过去的研究证明, 培养的 SMC^[4] 和单核/巨噬细胞^[5,6] 均可表达 MCP-1 mRNA 和蛋白, 当这些细胞暴露于氧化型 LDL 和氧化型 VLDL 后, 则可表达高水平的 MCP-1 mRNA 和蛋白。然而, 关于 MCP-1 在 As 病变内表达的报道国内外不多。

本实验喂家兔以高脂饲料, 复制了高脂血症和 As 模型。斑块组织匀浆的 Dot blot 分析显示, As 病变组织中有大量 MCP-1 mRNA 表达。将 As 病变中的 SMC 进行培养, 经夹心酶联免疫吸附法检测证明, 其条件培养基含有一定量 MCP-1 蛋白, 明显高于正常兔 SMC 条件培养基。免疫组织化学显示, As 病变内的各种细胞均表达 MCP-1 蛋白。这些结果与体外实验, 即当培养的动脉壁细胞暴露于氧化型 LDL 和氧化型 VLDL 后可表达高水平的 MCP-1 是一致的。提示在家兔食饵性 As 时, 在高脂血症的作用下, 参与 As 斑块形成的动脉壁细胞处于相当的活跃状态, 均不同程度地产生和分泌 MCP-1。

本实验结果表明, 斑块内的各种细胞中, 以巨噬细胞源性泡沫细胞的 MCP-1 表达最强, 结果与 Yla-Herttuala 等^[9] 所报道的一致。提示单核细胞/巨噬细胞参与单核细胞迁入内皮下间隙的过程, 即血液单核细胞一旦进入内皮下间隙, 摄取脂质, 形成泡沫细胞后, 可产生和分泌趋化因子(MCP-1 等), 招引其它单核细胞源源不断地迁入内膜, 在 As 病变的发生发展中起着重要作用。

参考文献

- 1 Yoshimura T. cDNA cloning of guinea pig monocyte chemoattractant protein-1 and expression of the recombi-