

[文章编号] 1007-3949(2003)11-01-0009-04

•实验研究•

## 同型半胱氨酸诱导 THP-1 单核细胞产生巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$

邢 玮, 邓仲端, 瞿智玲, 倪 娟

(华中科技大学同济医学院病理学系, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 病理学; 巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  对动脉粥样硬化斑块的作用; 酶联免疫吸附法; 同型半胱氨酸; 趋化作用; 单核细胞; 条件培养基

[摘 要] 为探讨同型半胱氨酸对人单核细胞表达和分泌巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  的影响并检测其活性, 在体外培养的 THP-1 单核细胞培养基中加入终浓度为 0.05 mmol/L、0.1 mmol/L 和 0.2 mmol/L 的同型半胱氨酸, 孵育 8 h, 或加入终浓度 0.1 mmol/L 的同型半胱氨酸, 分别孵育 4、8 及 16 h, 用酶联免疫吸附法检测其培养基中的分泌性巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$ 。用改良 Boyden 小室微孔滤膜法检测 THP-1 单核细胞条件培养基中巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  蛋白对外周血单核细胞的趋化活性。结果发现, 培养的 THP-1 单核细胞暴露于不同浓度或同一浓度不同孵育时间的同型半胱氨酸后, 其分泌至条件培养基中巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  蛋白呈浓度和时间依赖性递增 ( $P < 0.01$ )。趋化实验表明, 经同型半胱氨酸刺激的 THP-1 条件培养基引起单核细胞迁移距离 ( $83.2 \pm 4.8 \mu\text{m}$ ) 明显大于未经同型半胱氨酸刺激的条件培养基组 ( $73.2 \pm 2.3 \mu\text{m}$ ) 和随机移动组 ( $62.4 \pm 3.5 \mu\text{m}$ )。方差分析显示, 三组间均有显著性差异 ( $F = 310.70$ ,  $P < 0.01$ )。在经同型半胱氨酸刺激的 THP-1 条件培养基中加入巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  抗体后, 单核细胞的移动距离较不含抗体组明显缩短 ( $P < 0.01$ )。结果提示, 同型半胱氨酸能诱导 THP-1 单核细胞表达有趋化活性的分泌性巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$ , 并可能通过促进血液单核细胞迁入动脉内膜, 在动脉粥样硬化斑块的形成和发展中起重要作用。

[中图分类号] R362

[文献标识码] A

### Homocysteine Induces THP-1 Monocytes to Produce Secretory Macrophage Inflammatory Protein 1 $\alpha$

XING Wei, DENG Zhong-Duan, QU Zhi-Ling, and NI Juan

(Department of Pathology, Huazhong University of Science Technology, Tongji School of Medicine, Wuhan 430030, China)

[KEY WORDS] Homocysteine; Chemotaxis; Monocyte; Conditioned Medium; Migration Distance; Arterial Intima

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether homocysteine (HCY) induce the expression of secretory macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) in THP-1 monocytes. **Methods** After exposure of the cultured THP-1 monocytes to HCY at increasing concentrations (0.05, 0.1 and 0.2 mmol/L) for 8 h, or at a concentration of 0.1 mmol/L for different incubation times (4, 8 and 16 h), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine MIP-1 $\alpha$  protein expression in the cultured supernate of each group. Conditioned media with or without HCY (0.01 mmol/L) were collected for chemotaxis assay by micropore filter method using a modified Boyden Chamber. **Results** ELISA showed that the exposure of THP-1 monocytes to HCY at different concentrations and for different times induced higher production of MIP-1 $\alpha$  protein compared with the control ( $P < 0.01$ ).

The MIP-1 $\alpha$  protein in cultured supernate was increased in a dose- and time-dependent manner. In chemotaxis assay, the migration distance of monocytes in HCY stimulating group was  $83.2 \pm 4.8 \mu\text{m}$ , which was significantly longer than that in the non-HCY stimulating group ( $73.2 \pm 2.3 \mu\text{m}$ ) and random migration group ( $62.4 \pm 3.5 \mu\text{m}$ ) ( $F = 310.70$ ,  $P < 0.01$ ). After adding goat anti-human MIP-1 $\alpha$  antibody, the monocyte chemotactic activity was noticeably inhibited, compared with the HCY stimulating group without specific antibody ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** HCY can induce THP-1 monocytes to express MIP-1 $\alpha$  and secret into culture medium, which share partial chemotactic activity for peripheral monocytes, and may play an important role in atherogenesis through promoting the recruitment of monocytes into arterial intima.

血浆同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)浓度升

高是心血管疾病一个独立的危险因子<sup>[1]</sup>。但其发病机制尚未完全阐明。在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)斑块形成中, 趋化因子的趋化作用对单核/巨噬细胞向动脉内膜的迁移、聚集至关重要。最近的研究表明, HCY 可诱导外周血单核细胞及内皮细胞表达多种趋化因子<sup>[2,3]</sup>, 包括单核细胞趋化蛋白 1

[收稿日期] 2000-09-24 [修回日期] 2003-01-02

[基金项目] 国家自然科学基金(39730220)资助

[作者简介] 邢玮, 女, 1971 年出生, 吉林省榆树市人, 博士研究生。E-mail: bettykathy@hotmail.com。邓仲端, 男, 1927 年出生, 广西壮族自治区南宁市人, 教授, 博士研究生导师。瞿智玲, 女, 1970 年出生, 河南省商丘市人, 主管技师。

(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted)、白细胞介素 8(interleukin 8, IL-8)等。巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$ (macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ )是一种主要对单核细胞和淋巴细胞具有趋化作用的趋化因子<sup>[4]</sup>,它在 HCY 引起 As 发病过程中的作用目前尚未见报道。本研究旨在观察 HCY 是否能刺激 THP-1 单核细胞产生分泌性 MIP-1 $\alpha$  蛋白,并测定其活性,从而探讨 HCY 在 As 发病机制中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 THP-1 单核细胞的培养

THP-1 单核细胞购自武汉大学典型培养物保藏中心(CTCC)。将 THP-1 单核细胞悬浮培养于 PR-MI1640 培养基(Gibco 公司)中,含 2 mmol/L 谷氨酰胺,15 mmol/L HEPES,1.0 mmol/L 丙酮酸钠,100 000 u/L 青霉素,100 mg/L 链霉素及  $5 \times 10^{-5}$  mol/L  $\beta$ -巯基乙醇,10% 胎牛血清(Gibco 公司)。细胞培养于 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中,每 2~3 天传代一次,使细胞密度保持在  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ /L 之间。

### 1.2 酶联免疫吸附法

将生长良好的细胞以无血清 DME/F12 培养基(Gibco 公司)培养 12 h,然后随机分为实验组和对照组,每组细胞数相同。实验组又分为二:不同浓度组分别培养于含 0.05 mmol/L、0.1 mmol/L 和 0.2 mmol/L HCY 的 DME/F12 培养基 8 h;不同孵育时间组加入含 0.1 mmol/L HCY 的 DME/F12 培养基,分别培养 4、8 和 16 h。对照组加不含 HCY 的 DME/F12 培养基。收集各组培养基,用人 MIP-1 $\alpha$  酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)定量试剂盒(Endogen 公司)测定 THP-1 单核细胞分泌至培养基中 MIP-1 $\alpha$  蛋白的含量。将双份标准品(大肠杆菌重组人 MIP-1 $\alpha$ )或样品加入已包被抗人 MIP-1 $\alpha$  抗体的 96 孔板,操作严格按试剂盒说明书进行,实验结果在 450 nm 波长读取吸光度值,并根据标准曲线计算培养基中的 MIP-1 $\alpha$  含量。实验重复 3 次,且每次双份样品的吸光度值控制在平均值 10% 以内。

### 1.3 趋化试验

用改良的 Boyden 小室进行<sup>[5]</sup>。THP-1 单核细胞用 0.1 mmol/L HCY 或无 HCY 的 DME/F12 孵育 8 h,然后收集其培养基(即条件培养基),于 4℃、PBS 透析 24 h 备用。上室(0.8 mL)加入非条件培养基或条件培养基的单核细胞悬液,调细胞浓度为  $(0.5 \sim$

$1) \times 10^9$ /L,上、下室之间隔以硝酸纤维素微孔滤膜(孔径 8  $\mu$ m,直径 13 mm,厚 150  $\mu$ m, Schleicher-Schuell 公司)。新鲜人外周血单核细胞分离参照文献[6]。趋化实验分组如下(表 1, Table1)。

表 1. 趋化实验分组

Table 1. The groups of chemotaxis assay

分组	上室	下室
随机移动组	UCM	UCM
同型半胱氨酸对照组	UCM	HUCM
阳性对照组	UCM	5% ACS
趋化运动组 1	UCM	NHCM
趋化运动组 2	UCM	HCM
化学促动组 1	NHCM	NHCM
化学促动组 2	HCM	HCM
抗体抑制组	UCM	AMHCM
抗体对照组	UCM	AMUCM

UCM: 非条件培养基; ACS: 活化血清; HUCM: 含 0.1 mmol/L HCY 的非条件培养基; NHCM: 无 HCY 刺激的条件培养基; HCM: HCY 刺激的条件培养基; AMUCM: 含 MIP-1 $\alpha$  抗体的非条件培养基; AMHCM: 含 MIP-1 $\alpha$  抗体的条件培养基。

抗体抑制实验将羊抗人 MIP-1 $\alpha$  单克隆抗体(Sigma)加入条件培养基中,终浓度为 0.5 mg/L,37℃温育 2 h,800  $\times$  g 离心 2 min,以去除免疫复合物,上清则用作趋化实验的实验液。加好各组实验液后,将小室置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中温育 80 min。取出滤膜,依次放入染色架的铜网间,置于纯正丙醇中固定, Harris 苏木素染色,逐级正丙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。在显微镜下(物镜  $\times 40$ ,目镜  $\times 10$ ),用微调手轮调焦距对准滤膜表面(可见膜结构和大量单核细胞)作为起点,向下转动手轮,可见细胞数逐渐减少,至仅见 1~2 个单核细胞时,即为移动终点。从微调手轮的刻度上直接读出起点至终点的  $\mu$ m 数,即单核细胞移动距离。每膜随机取 5 个视野,每组两张膜共 10 个视野,实验重复 3 次。

### 1.4 统计学处理

各组数据都以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间差异以方差进行统计学处理。

## 2 结果

### 2.1 酶联免疫吸附法检测结果

同型半胱氨酸(HCY)处理培养 THP-1 单核细胞可使其合成的分泌性 MIP-1 $\alpha$  显著升高,且培养基中

MIP-1 $\alpha$  蛋白的含量与 HCY 呈剂量和时间依赖性增加。0.05、0.1 和 0.2 mmol/L HCY 组培养基中 MIP-1 $\alpha$  蛋白水平分别为对照组的 1.4、2.2 和 2.9 倍, 方差分析显示差异有显著性 ( $P < 0.01$ )。以 0.1 mmol/L HCY 处理 THP-1 单核细胞可使其合成分泌至培养基中 MIP-1 $\alpha$  蛋白于 4 h、8 h 和 16 h 逐渐升高, 分别为对照组的 1.7、2.2 和 2.6 倍, 组间差异有极显著意义 ( $P < 0.01$ ; 表 2, Table 2)。

表 2. THP-1 单核细胞培养基中巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  蛋白的表达

Table 2. The expression of MIP-1 $\alpha$  protein in THP-1 monocytes culture supernate ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

同型半胱氨酸浓度分组 (mmol/L)	MIP-1 $\alpha$ 蛋白定量
对照组	84.3 $\pm$ 2.7
0.05	120.3 $\pm$ 10.7 <sup>a</sup>
0.1	185.9 $\pm$ 6.4 <sup>ab</sup>
0.2	241.1 $\pm$ 6.4 <sup>abc</sup>
同型半胱氨酸时间分组 (h)	
对照组	84.3 $\pm$ 2.7
4	145.4 $\pm$ 5.1 <sup>a</sup>
8	185.9 $\pm$ 6.4 <sup>ad</sup>
16	222.1 $\pm$ 9.5 <sup>ade</sup>

a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.01$ , 与 0.05 mmol/L HCY 组比较; c:  $P < 0.01$ , 与 0.1 mmol/L HCY 组比较; d:  $P < 0.01$ , 与 4 h 组比较; e:  $P < 0.01$ , 与 8 h 组比较。

## 2.2 趋化实验结果

趋化实验表明, 经 HCY 刺激 THP-1 的条件培养基(HCM)引起单核细胞迁移距离(83.2  $\pm$  4.8  $\mu$ m)明显大于未经 HCY 刺激的条件培养基(NHCM)组(73.2  $\pm$  2.3  $\mu$ m)和随机移动组(62.4  $\pm$  3.5  $\mu$ m), 方差分析显示三组间均有显著性差异 ( $F = 310.70$ ,  $P < 0.01$ )。而化学促动组和 HCY 移动组的迁移距离与随机移动组无明显差异(表 3, Table 3)。说明单核细胞的迁移距离增加并非条件培养基的化学促动作用, 且 HCY 对单核细胞没有直接的趋化作用。在 HCM 中加入 MIP-1 $\alpha$  抗体后, 单核细胞的移动距离(76.0  $\pm$  4.2  $\mu$ m)较不含抗体组(83.2  $\pm$  4.8  $\mu$ m)明显缩短 ( $P < 0.01$ ), 但仍高于随机移动组 ( $P < 0.01$ ; 表 4, Table 4)。提示单核细胞的迁移至少有 MIP-1 $\alpha$  的趋化作用, 而且可能还有其他趋化因子存在, 与 MIP-1 $\alpha$  协同促进单核细胞的迁移。

表 3. 同型半胱氨酸刺激的条件培养基所致的单核细胞迁移  
Table 3. The migration of monocytes induced by HCM ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 30$ )

分 组	移动距离 ( $\mu$ m)
随机移动组	62.4 $\pm$ 3.5
同型半胱氨酸对照组	63.0 $\pm$ 2.9
阳性对照组	93.2 $\pm$ 3.0 <sup>a</sup>
趋化运动组 1	73.2 $\pm$ 2.3 <sup>a</sup>
趋化运动组 2	83.2 $\pm$ 4.8 <sup>ab</sup>
化学促动组 1	63.2 $\pm$ 3.2
化学促动组 2	62.6 $\pm$ 2.9

a:  $P < 0.01$ , 与随机移动组比较; b:  $P < 0.01$ , 与趋化运动组 1 比较。

表 4. 巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  抗体对同型半胱氨酸刺激的条件培养基趋化活性的影响

Table 4. The effect of MIP-1 $\alpha$  antibody to chemotactic activity of HCM ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 30$ )

分 组	移动距离 ( $\mu$ m)
随机移动组	62.4 $\pm$ 3.5
趋化运动组 2	83.2 $\pm$ 4.8
抗体抑制组	76.0 $\pm$ 4.2 <sup>ab</sup>
抗体对照组	64.2 $\pm$ 3.6

a:  $P < 0.01$ , 与随机移动组比较; b:  $P < 0.01$ , 与趋化运动组 2 比较。

## 3 讨论

血浆 HCY 升高见于 20% ~ 30% As 患者<sup>[1]</sup>。在我国, 正常人血浆 HCY 水平一般在 14  $\mu$ mol/L 以下, 而冠心病、脑卒中患者平均 17 ~ 20  $\mu$ mol/L, 血浆 HCY 水平与心血管病变程度和并发症呈正相关<sup>[7]</sup>。因此, 高同型半胱氨酸血症是心脑血管疾病的一个新的重要的危险因子, 其发病机制的研究受到广泛关注。众所周知, As 病灶的形成是一个复杂的病理过程<sup>[8]</sup>, 涉及损伤的内皮与单核、巨噬细胞和平滑肌细胞之间的相互作用, 以及局部产生的细胞因子、生长因子的网络调控等。大量实验证明单核/巨噬细胞参与 As 全过程的所有阶段, 被认为是疾病过程中主要的炎症介导者<sup>[8]</sup>。它既对血管壁其他细胞产生的调节性分子发生反应, 其自身又可分泌多种细胞因子、趋化因子和生长因子<sup>[9]</sup>。因此, 从单核细胞入手无疑有助于进一步了解疾病的发病机制。THP-1 细胞为人单核细胞株, 具有人外周血单核细胞相似的特性, 在国内外广泛应用于单核细胞源性细胞因子的研究并可作为趋化实验的靶细胞<sup>[10]</sup>。Wang

等<sup>[11]</sup>证实 HCY 能诱导 THP-1 巨噬细胞产生 MCP-1。

巨噬细胞炎症蛋白 1 $\alpha$ (MIP-1 $\alpha$ ) 与 MCP-1 同属 C-C 型趋化因子,其主要功能是对单核细胞的趋化作用<sup>[8,9]</sup>。体内实验明确证实了 MIP-1 $\alpha$  在体内可活化血管内皮,引起单核细胞、淋巴细胞浸润<sup>[12]</sup>。MIP-1 $\alpha$  还可趋化 CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T 细胞及树突状细胞<sup>[13]</sup> 迁移进入免疫反应部位,协调免疫反应的发生,并能调节外周血单核细胞基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP) 的产生,介导基质降解,从而在单核细胞迁入动脉内膜的过程中发挥作用<sup>[14]</sup>。在 As 斑块中,T 淋巴细胞、单核/巨噬细胞、嗜中性粒细胞等都表达 MIP-1 $\alpha$ <sup>[15]</sup>。本研究证明了 HCY 可刺激 THP-1 细胞表达分泌性 MIP-1 $\alpha$  蛋白,这种作用呈时间、剂量依赖性增加;其条件培养基表现出对单核细胞的趋化活性。加入 MIP-1 $\alpha$  抗体抑制 MIP-1 $\alpha$  作用后,单核细胞的趋化运动明显降低,提示 HCY 是通过促进单核细胞产生的 MIP-1 $\alpha$  及其他趋化因子使单核细胞发生迁移,并非化学促动作用,亦非 HCY 本身的作用。

因此,可以推测高同型半胱氨酸血症可通过刺激外周血单核细胞表达 MIP-1 $\alpha$  等多种趋化因子及其他细胞因子,介导内皮和基底膜损伤,促进单核细胞、淋巴细胞与内皮细胞的相互作用并迁移至内皮下间隙,从而导致 As 病变的形成和发展。

#### [参考文献]

- [1] Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med*, 1998, **338** (15): 1 042-050
- [2] Holven KB, Aukrust P, Holm T, Ose L, Nenseter MS. Folic acid treatment re-

duces chemokine release from peripheral blood mononuclear cells in hyperhomocysteinemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (4): 699-703

- [3] Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, Robinson K, Jacobsen DW. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein 1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation*, 2001, **103** (22): 2 717-723
- [4] Oh KO, Zhou Z, Kim KK, Samanta H, Fraser M, Kim YJ, et al. Identification of cell surface receptors for murine macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ . *J Immunol*, 1991, **147** (9): 2 978-983
- [5] 赵霞,祝学卫,杨丽敏,邓仲端,朱大和. 脂质过氧化诱导培养的内皮细胞产生单核细胞趋化因子 RANTES. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (4): 281-284
- [6] Stengel D, Antonucci M, Gaoua W, Dacht C, Lesnik P, Hourton D, et al. Inhibition of LPL expression in human monocyte derived macrophages is dependent on LDL oxidation state: a key role for lysophosphatidylcholine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18** (7): 1 172-180
- [7] 高炜. 全国高同型半胱氨酸血症与疾病学术研讨会纪要. *中华医学杂志*, 1999, **79** (6): 406-410
- [8] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1990, **362** (6423): 801-809
- [9] Reape TJ, Groot PH. Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 1999, **147** (2): 213-225
- [10] Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocyte leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*, 1980, **26** (2): 171-176
- [11] Wang G, Siow YL. Homocysteine stimulates nuclear factor- $\kappa$ B activity and monocyte chemoattractant protein 1 expression in vascular smooth muscle cells: a possible role for protein kinase C. *Biochem J*, 2000, **352** (Pt 3): 817-826
- [12] Lee SC, Brummet ME, Shahabuddin S, Woodworth TG, Georas SN, Leiferman KM, et al. Cutaneous injection of human subjects with macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  induces significant recruitment of neutrophils and monocytes. *J Immunol*, 2000, **164** (6): 3 392-401
- [13] Sozzani S, Sallusto F, Luini W, Zhou D, Piemonti L, Allavena P, et al. Migration of dendritic cells in response to formyl peptides C5a and a distinct set of chemokines. *J Immunol*, 1995, **155** (7): 3 292-295
- [14] Uguccioni M, D'Apuzzo M, Loetscher M, Dewald B, Baggiolini M. Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  on human monocytes. *Eur J Immunol*, 1995, **25** (1): 64-68
- [15] Kasama T, Trieter RM, Lukacs NW, Burdick MD, Kunkel SL. Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *J Immunol*, 1994, **152** (7): 3 559-569

(此文编辑 文玉珊)

•读者•作者•编者•

## 关于在中国科技论文统计源期刊和中国科学引文数据库来源期刊中引用我刊文章获赠我刊次年杂志的告示(1)

本刊编辑部

论文被引用是发表的论文具有价值的体现。自创刊以来,我刊一直重视此项工作,极力鼓励作者引用中文文献,鼓励作者引用自己发表了论文,鼓励其他作者引用发表在我刊的论文。郑重许诺:“凡在中国科学技术论文统计源期刊和中国科学引文数据库来源期刊上发表的文章中引用了本刊的文章者,凭当期封面、目次页和文章的复印件可获赠第二年全年刊物一份。”在 2002 年内,经作者申报和编辑部查实,第一批有下列作者获赠 2003 年全年杂志一份:

夏 昱,郑州市第三人民医院神经内科;  
陈亚红,北京大学第三医院呼吸科;  
王关嵩,第三军医大学新桥医院全军呼吸内科  
研究所;

喻 红,武汉大学医学院生物化学教研室;  
任国庆,镇江医学院附属医院心内科;  
齐 峰,成都军区昆明总医院心内科;  
王锦生,上海市闸北区临汾医院心血管内科。