

# 单核细胞趋化蛋白 1 对人脐静脉平滑肌细胞增殖的影响

官秀梅, 钱民章

(遵义医学院生物化学教研室, 贵州省遵义市 563003)

[关键词] 细胞生物学; 单核细胞趋化蛋白 1 对血管平滑肌细胞的作用; 流式细胞术; 单核细胞趋化蛋白 1; 动脉粥样硬化;  $\alpha$ -fos 基因; 基因表达

[摘要] 目的 研究单核细胞趋化蛋白 1 对人脐静脉平滑肌细胞增殖的影响。方法 用不同浓度单核细胞趋化蛋白 1 (0.1、1.0、10 及 100  $\mu$ g/L) 作用于人脐静脉平滑肌细胞, 采用细胞计数、MTT、流式细胞术检测细胞增殖情况; 采用逆转录聚合酶链反应检测细胞中  $\alpha$ -fos 基因的表达。结果 单核细胞趋化蛋白 1 能诱导人脐静脉平滑肌细胞的增殖, 呈剂量依赖关系, 100  $\mu$ g/L 单核细胞趋化蛋白 1 对人脐静脉血管平滑肌细胞的增殖作用强于平滑肌细胞增殖因子血小板源生长因子的作用 ( $P < 0.001$ ), 单核细胞趋化蛋白 1 在诱导血管平滑肌细胞增殖的同时引起  $\alpha$ -fos 基因的高表达 ( $P < 0.001$ )。结论 单核细胞趋化蛋白 1 不仅是趋化激活剂, 而且是人脐静脉平滑肌细胞的促增殖因子, 并且其促增殖的功能可能与增强  $\alpha$ -fos 基因的表达有关。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

## Effect of Monocyte Chemotactic Protein-1 on the Proliferation of Human Umbilical Vein Smooth Muscle Cells

GUAN Xiu-Mei, and QIAN Min-Zhang

(Department of Biochemistry, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

[KEY WORDS] Monocyte Chemotactic Protein 1; Atherosclerosis;  $\alpha$ -fos Gene; Gene Expression; Human Umbilical Vein Smooth Cell; Flow Cytometry

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) on the proliferation of human umbilical vascular smooth muscle cells (hUVSMC). **Methods** hUVSMC were cultured in vitro. Growth-arrested hUVSMC were stimulated with different concentrations of MCP-1 (0.1, 1.0, 10 and 100  $\mu$ g/L). The response of hUVSMC to these treatments was observed in comparison with that of platelet derived growth factor (PDGF). The proliferation of hUVSMC was evaluated by cell counting, MTT assay and flow cytometry. The expression of  $\alpha$ -fos mRNA was detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** MCP-1 stimulated the proliferation of hUVSMC in a dose-dependent manner. Compared with PDGF, the effect of MCP-1 at high concentration was significant ( $P < 0.01$ ). Meanwhile, MCP-1 induced the expression of  $\alpha$ -fos mRNA. **Conclusions** MCP-1 could promote the proliferation of hUVSMC and the expression of  $\alpha$ -fos mRNA. The effect of MCP-1 at high concentration was more significant than that of PDGF. MCP-1 may exert its effects on cells through  $\alpha$ -fos.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是严重危害人类健康的疾病之一, 它是以动脉内膜下脂质沉积, 同时伴有平滑肌细胞和纤维基质成分增殖, 泡沫细胞形成特征的广泛性动脉病变。血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 是动脉粥样硬化斑块中最主要的细胞成分, VSMC 增殖是动脉粥样硬化发展过程中的关键变化<sup>[1]</sup>。研究各种生长因

子、血管活性物质等对 VSMC 转型、增殖及基质分泌的调节已成为探讨 As 发病机制的重要方面。

单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1) 属于趋化细胞因子家族中的 C-C 亚家族成员之一, 其分子结构中的四个半胱氨酸位于 11、12、36 和 52 位, 排列为 Cyt-Cyt。成熟的 MCP-1 是含有 76 个氨基酸残基的碱性蛋白, 存在着 O-连接的糖基化位点, 由于在细胞中表达时糖基化程度不同, 可产生不同分子量的 MCP-1<sup>[2]</sup>。MCP-1 是一种趋化激活剂。它可以特异地作用于血液中的单核细胞, 招引其迁移至内皮下, 形成泡沫细胞, 对动脉粥样硬化的发生发展产生重要的影响<sup>[3]</sup>。新的研究发现, MCP-1 不仅是趋化激活剂, 而且对 VSMC 的增殖也有影响。目前, 国外的一些学者对此进行了一

[收稿日期] 2004-07-21 [修回日期] 2005-01-12

[基金项目] 贵州省科技厅基金 [(2003) 3015] 资助

[作者简介] 官秀梅, 硕士研究生, E-mail 为 Guan\_xm@hotmail.com。  
通讯作者钱民章, 教授, 硕士研究生导师, 留美归国学者, 遵义医基础部主任, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制及天然产物防治的分子机理, E-mail 为 qian\_mzh@hotmail.com。

些研究<sup>[4-7]</sup>,但结果相互矛盾,因此 MCP-1 对 VSMC 增殖的影响及其机制还需要进一步探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

人 MCP-1、人血小板源生长因子(platelete derived growth factor, PDGF) 购于晶美生物公司, DMEM 培养基、MTT 购于华美公司,青霉素、链霉素和庆大霉素为华北制药厂产品,胰蛋白酶购于上海生物工程有限公司,碘化丙锭为 Sigma 公司产品, $\alpha$ -actin 免疫组织化学检测试剂盒、一步法逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒为基因公司产品,其余为国产分析纯。

### 1.2 人脐静脉平滑肌细胞培养

采用我室改良的植块贴壁法进行细胞培养<sup>[8]</sup>。将无菌分离的脐带,用 37℃ D-Hanks 液冲洗脐静脉血管内外的凝血块,纵向剪开血管腔,用手术刀片轻轻刮去血管内膜,棉签擦净;将血管中膜撕下,剪成约 0.2~0.5 cm<sup>3</sup> 小块,按 3~5 块/cm<sup>2</sup> 密度种植入 25 mL 玻璃培养瓶。在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培育。0.06% 胰蛋白酶溶液消化、传代。将培养的细胞在倒置显微镜下观察并拍照,用平滑肌细胞特异性  $\alpha$ -actin 单克隆抗体免疫组织化学法进行鉴定。本实验所用细胞均为第 3 代。

### 1.3 实验分组

实验分为 6 组:阴性对照组为含 1% FBS 的 DMEM 组;阳性对照组为 20  $\mu$ g/L PDGF 作用组;0.1  $\mu$ g/L MCP-1 作用组;1.0  $\mu$ g/L MCP-1 作用组;10  $\mu$ g/L MCP-1 作用组( $\alpha$ -fos 基因的表达只用此剂量组);100  $\mu$ g/L MCP-1 作用组。

### 1.4 细胞计数

将 VSMC 以  $2 \times 10^4$  细胞/孔接种于 24 孔板中,24 h 后换为含 1% FBS 的 DMEM,作用 48 h 后,按分组加入不同终浓度的 MCP-1 或 PDGF,作用 48 h。用 0.06% 胰蛋白酶消化,冷 PBS 悬浮细胞,在倒置显微镜下用细胞计数板计数。实验一式三份,重复三次。

### 1.5 MTT 检测

将 VSMC 以  $5 \times 10^3$  细胞/孔接种于 96 孔板中,24 h 后换为含 1% FBS 的 DMEM,作用 48 h 后,换为 100  $\mu$ L 不同终浓度的 MCP-1 或 PDGF 应用液,设无细胞的空白对照组,将 96 孔板放入 CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育 44 h。取出 96 孔培养板,每孔加入 20  $\mu$ L MTT (5 g/L),37℃ 继续孵育 4 h,终止培养。吸弃各孔培养液,每孔加入 100  $\mu$ L 二甲基亚砷,振荡 10 min,在酶标仪上测定各孔光吸收值(570 nm)。实验一式三

份,重复三次。

### 1.6 流式细胞仪分析细胞生长周期的变化

将 VSMC 以  $1 \times 10^6$  细胞/瓶接种于 50 mL 无菌的培养瓶中,孵育 24 h 后用含 1% FBS 的 DMEM 作用 48 h,换为不同终浓度的 MCP-1 或 PDGF 应用液,48 h 后终止培养。胰酶消化,离心,收集细胞,用冷乙醇固定,碘化丙锭染色。流式细胞仪检测(美国 BD 公司),结果用细胞增殖指数(proliferation index, PI)表示。实验一式三份,重复三次。

### 1.7 细胞总 RNA 的提取

将 VSMC 以  $1 \times 10^6$  细胞/瓶接种于 50 mL 无菌的培养瓶中,孵育 24 h 后用含 1% FBS 的 DMEM 作用 48 h,加入 100  $\mu$ g/L MCP-1 应用液,使其终浓度为 10  $\mu$ g/L,或加入相同体积 1% FBS 的 DMEM,30 min 后终止培养。胰酶消化,离心,收集细胞。采用异硫氰酸胍一步法提取细胞的总 RNA,紫外分光光度计测量其浓度和纯度,总 RNA 浓度(g/L) = OD<sub>260</sub>  $\times$  40  $\times$  稀释倍数  $\div$  1000。样品纯度的 A<sub>260</sub>:A<sub>280</sub>  $\geq$  1.8。RNA 琼脂糖电泳显示 5 s、18 s 和 28 s 三条带,表明 RNA 无降解。

### 1.8 逆转录聚合酶链反应

$\alpha$ -fos<sup>[9]</sup> 引物序列长度为 483 bp,上游引物 5' GAGATTGCCAACCTGCTGAA 3';下游引物 5' AGACGAAGGAAGACGT GTAA 3',GAPDH<sup>[10]</sup> 引物序列长度为 572 bp,由上海生物工程有限公司合成;采用一步法 RT-PCR 试剂盒进行反应。反应总体积为 50  $\mu$ L,反应条件为 50℃,30 min;95℃预变性 15 min;94℃变性 1 min;52℃退火 1 min;72℃延伸 1 min;最后 72℃延伸 10 min,循环 33 次。RT-PCR 产物用含溴乙锭的 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,电压 4 V/cm,电泳 2.5 h。在凝胶成像系统(英国 SYNGENE 公司)上观察结果并拍照。重复三次。

### 1.9 统计学处理

所有数据用 SPSS11.0 统计软件进行单因素方差分析,组间比较作 *t* 检验,结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, $P < 0.05$  表示有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 细胞培养与鉴定

显微镜下,细胞平行排列成“峰、谷”样结构特征。免疫组织化学结果显示 95% 为阳性 VSMC,并且纯度符合实验要求。

### 2.2 细胞计数

低浓度的 MCP-1 对 VSMC 即有明显的增殖作用( $P < 0.01$ ),随着其浓度的增高,MCP-1 对 VSMC 的

增殖作用也增强,呈剂量依赖关系。并且高浓度的 MCP-1 对 VSMC 的增殖作用强于 PDGF 的作用 ( $P < 0.01$ ; 表 1, Table 1)。

表 1. 不同浓度单核细胞趋化蛋白 1 作用人脐静脉血管平滑肌细胞 48 h 后细胞计数

Table 1. Cell number in hUVSMC after different dose MCP-1 treatment ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

分 组	细胞计数 ( $\times 10^7/L$ )
对照组	2.43 $\pm$ 0.13
PDGF	3.79 $\pm$ 0.06
0.1 $\mu g/L$ MCP-1	3.63 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>
1.0 $\mu g/L$ MCP-1	3.58 $\pm$ 0.31 <sup>a</sup>
10 $\mu g/L$ MCP-1	4.15 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
100 $\mu g/L$ MCP-1	5.33 $\pm$ 0.31 <sup>ab</sup>

a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.01$ , 与 PDGF 组比较。

2.3 MTT 结果

不同浓度的 MCP-1 均可明显诱导 VSMC 增殖 ( $P < 0.01$ ), 呈剂量依赖关系。并且高浓度的 MCP-1 对 VSMC 的增殖作用强于 PDGF 的作用 ( $P < 0.01$ ; 表 2, Table 2)。

表 2. 不同浓度的单核细胞趋化蛋白 1 诱导人脐静脉血管平滑肌细胞的 MTT 值

Table 2. MTT of hUVSMC after different dose MCP-1 treatment ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

分 组	A <sub>570</sub>
对照组	0.400 $\pm$ 0.010
PDGF	0.523 $\pm$ 0.015
0.1 $\mu g/L$ MCP-1	0.430 $\pm$ 0.020
1.0 $\mu g/L$ MCP-1	0.480 $\pm$ 0.010 <sup>a</sup>
10 $\mu g/L$ MCP-1	0.540 $\pm$ 0.010 <sup>a</sup>
100 $\mu g/L$ MCP-1	0.607 $\pm$ 0.015 <sup>ab</sup>

a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.01$ , 与 PDGF 组比较。

2.4 单核细胞趋化蛋白 1 对血管平滑肌细胞细胞周期的影响

0.1  $\mu g/L$  MCP-1 不影响 VSMC 的细胞周期分布, 1.0、10 及 100  $\mu g/L$  MCP-1 可使停留于静止期 ( $G_0$  期)/DNA 合成前期 ( $G_1$  期) 的细胞数减少, 而进入 DNA 合成期 (S 期) 及 DNA 合成后期 ( $G_2$  期)/分裂期 (M 期) 的细胞数明显增多, 增值指数与对照组相比明显增加, 呈剂量依赖关系 (表 3, Table 3)。

表 3. 不同浓度的单核细胞趋化蛋白 1 对人脐静脉血管平滑肌细胞细胞周期的影响

Table 3. Cell cycle distribution of hUVSMC after MCP-1 treatment ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

分 组	$G_0/G_1$	增值指数
对照组	90.5% $\pm$ 1.5%	9.5% $\pm$ 3.3%
20 $\mu g/L$ PDGF	81.5% $\pm$ 4.0%	18.5% $\pm$ 1.2%
0.1 $\mu g/L$ MCP-1	87.4% $\pm$ 1.6%	12.6% $\pm$ 1.3%
1.0 $\mu g/L$ MCP-1	82.1% $\pm$ 2.6%	17.8% $\pm$ 2.1% <sup>a</sup>
10 $\mu g/L$ MCP-1	74.0% $\pm$ 2.5%	26.0% $\pm$ 2.0% <sup>bc</sup>
100 $\mu g/L$ MCP-1	68.2% $\pm$ 3.9%	31.8% $\pm$ 3.2% <sup>bd</sup>

a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; c:  $P < 0.05$ , d:  $P < 0.01$ , 与 PDGF 组比较。

2.5 单核细胞趋化蛋白 1 对  $\sigma$ fos mRNA 表达影响

正常对照组 hUVSMC 中  $\sigma$ fos mRNA 的表达较低, 10  $\mu g/L$  MCP-1 作用 30 min 后,  $\sigma$ fos mRNA 相对表达量明显增高 ( $P < 0.01$ ), 提示 MCP-1 可以诱导  $\sigma$ fos 的表达 (图 1 和表 4, Figure 1 and Table 4)。

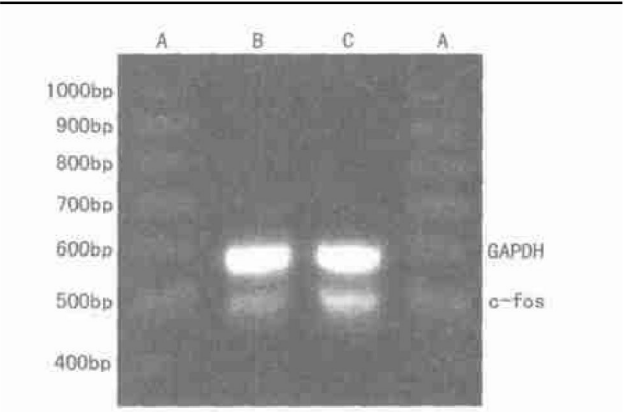


图 1. 逆转录聚合酶链反应产物琼脂糖凝胶电泳图 A 为标准对照, B 为空白对照, C 为 10  $\mu g/L$  单核细胞趋化蛋白 1 作用组。

Figure 1. The agarose gel electrophoretogram of RT-PCR products

表 4. 单核细胞趋化蛋白 1 对人脐静脉血管平滑肌细胞  $\sigma$ fos mRNA 表达的影响

Table 4.  $\sigma$ fos mRNA expression level of hUVSMC induced by MCP-1 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

分 组	相对表达量
对照组	0.36 $\pm$ 0.01
10 $\mu g/L$ MCP-1	0.56 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

### 3 讨论

血管平滑肌细胞(VSMC)是参与动脉粥样硬化病理过程的重要细胞,它的增殖及内膜下移行是动脉粥样硬化早期及经皮腔内冠状动脉成形术后再狭窄等血管闭塞性疾病的主要病理特征之一。探讨SMC增殖的机理及抑制VSMC增殖的方法对防治动脉粥样硬化病变十分重要。

本实验采用原代培养的hUVSMC,来源于人体,材料易得,原代培养的细胞传代次数少,更接近于体内细胞的生理特性,在动脉粥样硬化的研究中得到了广泛应用。本实验采用的植块贴壁法,与传统的消化法比较,具有稳定性好,培养时间短,细胞产量高,质量好等特点。

本实验结果表明,MCP-1在0.1~100 µg/L范围内(0.1、1.0、10及100 µg/L)能诱导人VSMC的增殖,并且MCP-1的这种促增殖能力随着其浓度的增加而增强,呈剂量依赖关系,说明MCP-1是人VSMC增殖诱导剂。Selzman等<sup>[4]</sup>选用0.1~100 µg/L MCP-1作用于人VSMC,结果发现MCP-1在1.0 µg/L时对VSMC的增殖能力最强,而后随着MCP-1浓度的增加细胞增殖效应减弱;Porreca等<sup>[5]</sup>用人MCP-1作用于鼠VSMC,结果发现MCP-1在50~200 µg/L浓度范围、作用72 h内均可使鼠VSMC增殖,并且随着MCP-1浓度的增加作用增强;结合本实验结果分析,从而认为MCP-1是促VSMC分裂的细胞因子,但是它对不同种属来源的VSMC增殖效应可能有差别,而且这种效应可能与作用时细胞的密度以及MCP-1作用时间等均有关系,值得进一步探讨。在动脉粥样硬化发病机制中MCP-1不仅是趋化激活因子,对泡沫细胞的形成极为重要,又能促进VSMC增殖,因此在研究防治动脉粥样硬化的策略时抑制MCP-1的表达十分重要。

原癌基因c-fos、c-myc、c-jun在调节细胞周期的启动和维持持续分裂的过程中发挥重要效应。研究发现c-fos和c-myc基因的激活是平滑肌细胞增殖的始动因素<sup>[11,12]</sup>,细胞增殖的刺激因素首先引起c-fos和c-myc的高表达,随后才出现细胞迅速增殖,DNA合成增加,肌动蛋白含量升高<sup>[13]</sup>。有研究表明,c-fos基因的调控发生在转录水平,而c-myc基因的调控发生在转录后水平<sup>[14]</sup>。为了进一步了解MCP-1诱导的平滑肌细胞增殖原理,本实验采用10 µg/L

MCP-1作为诱导剂,用RT-PCR方法检测MCP-1作用30 min时平滑肌细胞c-fos mRNA的表达情况,结果发现c-fos mRNA的表达增高,48 h后平滑肌细胞出现增殖效应,提示MCP-1诱导的VSMC增殖可能与其升高c-fos基因的表达有关。本实验结果表明MCP-1可诱导平滑肌细胞c-fos mRNA转录增高;MCP-1诱导平滑肌细胞增殖与c-fos mRNA表达升高有关;MCP-1诱导c-fos表达增高发生在转录水平,引起c-fos蛋白的合成增加,进而诱导细胞增殖。本实验为动脉粥样硬化的发病机制研究提供了新的资料。

#### [参考文献]

- [1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801-809
- [2] Lubkowski J, Bujacz G, Boque L, Domaille PJ, Handel TM, Wlodawer A. The structure of MCP-1 in two crystal forms provides a rare example of variable quaternary interactions. *Nat Struct Biol*, 1997, **4** (1): 64-69
- [3] 李福生, 王宗立, 许漫, 乔绘红, 刘佩毛, 张华. 表达反义单核细胞趋化蛋白1的重组逆转录病毒对家兔动脉平滑肌细胞趋化蛋白1基因表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (4): 283-287
- [4] Selzman CH, Miller SA, Zimmerman MA, Gamboni-Robertson F, Harken AH, Banerjee A. Monocyte chemoattractant protein 1 directly induces human vascular smooth muscle proliferation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, **283** (4): H1455-461
- [5] Porreca E, Di Febbo C, Reale M, Castellani ML, Baccante G, Barbacane R, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) is a mitogen for cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Vasc Res*, 1997, **34** (1): 58-65
- [6] Ikeda U, Okada K, Ishikawa S, Saito T, Kasahara T, Shimada K. Monocyte chemoattractant protein 1 inhibits growth of rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 1995, **268** (3 Pt 2): H1021-026
- [7] Watanabe T, Pakala R, Katagiri T, Benedict CR. Monocyte chemoattractant protein 1 amplifies serotonin-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Vasc Res*, 2001, **38** (4): 341-349
- [8] 张闻宇, 吴芹, 官秀梅, 钱民章. 一种改进的人脐静脉平滑肌细胞培养方法. *遵义医学院学报*, 2004, **27**: 68-69
- [9] Grundker C, Volker P, Emons G. Antiproliferative signaling of luteinizing hormone-releasing hormone in human endometrial and ovarian cancer cells through G protein alpha (1)-mediated activation of phosphotyrosine phosphatase. *Endocrinology*, 2001, **142** (6): 2369-380
- [10] Lee SK, Kim BS, Yang WS, Kim SB, Park SK, Park JS. High glucose induces MCP-1 expression partly via tyrosine kinase/AP-1 pathway in peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int*, 2001, **60** (1): 55-64
- [11] 张衡. 医学分子生物学. 北京: 北京医科大学出版社, 1999: 885-886
- [12] 刘学文, 从祥凤. 同型半胱氨酸对人脐静脉内皮细胞增殖的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (4): 332
- [13] Rubin P, Williams JP, Riggs PN, Bartos S, Sarac T, Pomerantz R, et al. Cellular and molecular mechanisms of radiation inhibition of restenosis. Part I: role of the macrophage and platelet-derived growth factor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1998, **40** (4): 929-941
- [14] 董晓雁, 方向明, 郑民安, 胡继军, 林桂珍, 蒋雯. 应用原位逆转录PCR技术检测Captopril对动脉粥样斑块中c-myc和c-fos mRNA表达的影响. *中国心血管杂志*, 2002, **7** (1): 3-5

(此文编辑 文玉珊)