

基质细胞衍生因子 1 对低密度脂蛋白诱导单核-内皮细胞粘附的影响

危当恒^{1,2}, 王贵学¹, 王 佐^{1,2}, 刘录山^{1,2}, 吕运成², 唐朝克^{1,2}

(1. 重庆大学生物工程学院, 生物力学与组织工程教育部重点实验室, 重庆市 400044;

2. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 生物工程; 内皮细胞; 单核细胞; 细胞粘附; 低密度脂蛋白; 基质细胞衍生因子 1

[摘要] **目的** 观察基质细胞衍生因子 1 对低密度脂蛋白诱导的单核细胞-内皮细胞粘附的调节作用, 以进一步探讨基质细胞衍生因子 1 在动脉粥样硬化中的作用。**方法** 密度梯度离心法分离人低密度脂蛋白; 逆转录聚合酶反应检测内皮细胞基质细胞衍生因子 1 mRNA 表达, Western blot 检测基质细胞衍生因子 1 蛋白质的表达; 细胞计数法观察低密度脂蛋白及基质细胞衍生因子 1 抗体干预对内皮细胞/单核细胞粘附的影响。**结果** 对照组几乎没有基质细胞衍生因子 mRNA 以及蛋白质的表达, 随着低密度脂蛋白浓度增加, 基质细胞衍生因子 1 mRNA 以及蛋白质的表达水平明显增加。低密度脂蛋白浓度为 50 mg/L、100 mg/L 和 150 mg/L 时, 每个视野粘附的单核细胞数分别为 60 ± 20 、 97 ± 26 和 170 ± 32 , 而正常对照组为 20 ± 5 , 差异有极显著性意义 ($P < 0.01$)。终浓度为 0.1 mg/L、0.5 mg/L 和 1 mg/L 基质细胞衍生因子 1 抗体干预后, 粘附的单核细胞数分别为 113 ± 23 、 53 ± 21 和 41 ± 10 , 均低于低密度脂蛋白对照组的 186 ± 31 , 与低密度脂蛋白对照组差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。**结论** 低密度脂蛋白促进内皮细胞与单核细胞的粘附, 其机制与促进内皮细胞表达基质细胞衍生因子 1 密切相关。

[中图分类号] Q81

[文献标识码] A

Effect of Stromal Derived Factor-1 on Low Density Lipoprotein Inducing Adhesion of Monocyte and Endothelial Cells

WEI Dang-Heng^{1,2}, WANG Gui-Xue¹, WANG Zuo^{1,2}, LIU Lu-Shan^{1,2}, LV Yur-Cheng², and TANG Chao-Ke^{1,2}

(1. Bioengineering College of Chongqing University and Key Lab for Biomechanics • Tissue Engineering of Ministry of Education, Chongqing 400044; 2. The Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Endothelial Cells; Monocytes; Cell Adhesion; Low Density Lipoprotein; Stromal Derived Factor 1

[ABSTRACT] **Aim** To observe the regulation of stromal derived factor 1 (SDF-1) on monocytes-endothelial cells induced by low density lipoprotein (LDL). **Methods** LDL was separated by density gradient centrifugation. Reverse transcript-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were separately used to detect the expression of mRNA and protein of SDF-1 in endothelial cells. Cell counting was used to observe the effect of the adhesion of monocytes/endothelial cells treated with LDL or SDF-1 antibody. **Results** Compared with the control group, the level of expression in LDL treated groups increased evidently as the LDL concentration increased. The adhered amount of monocytes to endothelial cells were 60 ± 20 , 97 ± 26 , 170 ± 32 , respectively responding to the LDL concentration 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L. And the amount was 20 ± 5 in the control ($P < 0.01$). While endothelial cells were incubated with SDF-1 antibody with 0.1 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L respectively before LDL incubation, the adhesion of monocytes was 113 ± 23 , 53 ± 21 , 41 ± 10 respectively. They were significantly lower than that of control group (186 ± 31) ($P < 0.05$). **Conclusion** LDL increased the adhesion between monocytes and endothelial cells, which is closely correlative to the increasing expression of SDF-1 in endothelial cells.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是动脉血管壁一种慢性炎症性疾病, 其确切机制还未完全阐明, 很多因素可促进其发生发展。动脉内皮层长期反复受

损及其功能障碍是动脉粥样硬化病变形成的始动环节, 单核细胞与血管内皮细胞粘附是 As 发病的早期现象之一^[1], 也是 As 发生的重要步骤。内皮细胞表达粘附分子并与单核细胞发生粘附是内皮细胞功能受损而处于激活状态的表现之一, 而血液中大量的低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 是引起内皮损伤的一个重要有害因素, 并能引起白细胞在内皮细胞表面的粘附^[2]。基质细胞衍生因子 1 (stromal derived factor-1, SDF-1) 是 CXC 家族趋化蛋白, 近年来研究发现动脉粥样硬化斑块中有 SDF-1

[收稿日期] 2005-09-14 [修回日期] 2006-05-21

[基金项目] 教育部重点科技研究基金项目 (104158); 重庆市教委科技研究基金项目 (030001)

[作者简介] 危当恒, 博士研究生, 研究方向为生物力学, 联系电话 023-65120497。通讯作者王贵学, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉硬化的发病机制以及生物力学与生物材料学的研究, 联系电话 023-65112675, E-mail 为 wanggx@cq. edu. cn。王佐, 博士, 副教授, 硕士研究生导师。

大量表达,对淋巴细胞和单核细胞有强烈的趋化作用。本文进一步探讨 SDF-1 对 LDL 诱导的单核细胞与内皮细胞粘附的调节作用。

1 材料和方法

1.1 低密度脂蛋白的提取

参照文献[3],取人新鲜血浆 100~200 mL,加入 PDB 以防腐和防氧化。在 8℃用 42 kr/min 超速离心 18 h。吸出漂浮于离心管上层的乳白色液体(VLDL)及次层淡黄色液体(IDL)。收集离心管下层液体,加入固体 KBr 使最终密度为 1.063 kg/L。再次在 8℃用 42 kr/min 超速离心 20 h,吸出上层橙黄色液体即 LDL。提纯的 LDL 在含 200 μ mol/L EDTA 的 PBS 液中透析 48 h,过滤除菌,4℃保存。

1.2 内皮细胞的培养及实验分组

人脐静脉内皮细胞株 ECV-304(上海典型物培养中心),用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基(GIBCO 公司)培养,第 3~5 代用于实验,用无血清 RPMI1640 液培养 12 h 使细胞同步化。然后进行分组处理:正常组继续用 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基培养 24 h;④低浓度 LDL 组用 50 mg/L LDL 孵育 24 h;④中浓度 LDL 组用 100 mg/L LDL 孵育 24 h;高浓度 LDL 组用 150 mg/L LDL 孵育 24 h。培养温度为 37℃。

1.3 逆转录聚合酶链反应检测基质细胞衍生因子 1 mRNA 的表达

用 TRIZOL RNA 抽提液提取细胞总 RNA, RNA 浓度以紫外分光光度计(美国 PE 公司 Lambda25 型)重复测量 3 次, A260nm/A280nm 比值在 1.8 以上方可用。取 1.0 μ g 总 RNA 为模板,以 Oligo(dT) 16 为引物进行逆转录。反应条件为 65℃变性 5 min, 42℃反应 50 min, 70℃终止反应 15 min。扩增 SDF-1 的引物为:正义序列引物 5'-AAG CCC GTC AGC CTG AGC TAG-3', 反义序列引物 5'-AGT TAT CTA CAT CTT GAA CCT CT-3', 预计扩增产物全长 495 bp。以 3 磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内对照,扩增 GAPDH 引物为:正义引物序列 5'-TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG-3', 反义序列引物:5'-TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG-3', 预计扩增产物全长 697 bp, 均由上海生工合成。取逆转录产物 2 μ L 分别进行聚合酶链反应。反应条件为:94℃预变性 5 min 后 94℃变性 30 s \rightarrow 58℃退火 45 s \rightarrow 72℃延伸 1 min; 28 个循环后, 72℃延伸 10 min。取 5 μ L 聚合酶链反应产物作琼脂

糖凝胶电泳。并利用凝胶成像系统作结果分析。

1.4 Western blotting 检测基质细胞衍生因子 1 蛋白的表达

将细胞从温箱中取出,吸出旧培养基,用 PBS 洗一次,用细胞刮刮下细胞,离心 10 min,并弃上清,加入细胞裂解液进行细胞裂解,4℃离心 10 min,弃除沉淀,BCA 法进行蛋白质定量,取 50 μ g 蛋白加入 2 \times SDS 凝胶加样缓冲液中,100℃加热 10 min 让蛋白质变性。用 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,转 PVDF 膜,丽春红染色观察转膜效果,并确定蛋白质分子标准位置。封闭液封闭 2 h,按 1:200 加入兔抗人 SDF-1 一抗,4℃封闭过夜,TBST 洗 3 次,1:2 000 加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次,用蛋白印迹荧光检测试剂盒显示于 X 光片。结果用 Labwork 凝胶图象分析系统对胶片进行扫描,并以对照组的面积灰度值为 100% 与实验组进行比较和半定量分析。

1.5 低密度脂蛋白对内皮细胞-单核细胞粘附的影响

参照 Kim 等^[4]的方法,先将内皮细胞接种于 96 孔板,待长成单层后,吸去普通 DMEM 培养基,加入含有 50 mg/L、100 mg/L 和 150 mg/L LDL 的 DMEM 培养基,每个浓度加 4 个孔,对照组 4 个孔加普通 DMEM。细胞培养箱内孵育 24 h,然后吸去培养基,加入 THP-1 细胞,种植密度为 4 \times 10⁴/孔,37℃孵育 30 min,吸去培养基,用 PBS 轻轻洗涤 2 遍,去除未粘附细胞,1% 戊二醛固定,于倒置显微镜下计数上下左右中 5 个视野粘附的单核细胞数,取平均值。

1.6 基质细胞衍生因子 1 抗体对低密度脂蛋白诱导的单核细胞粘附的影响

将内皮细胞接种于 96 孔板,待长成单层后吸去普通 DMEM 培养基,分成四组,加入 SDF-1 抗体,终浓度分别为 0、0.1、0.5 和 1 mg/L,加入 LDL,终浓度为 150 mg/L,孵育 24 h,吸去培养基。加入 THP-1 细胞,其余处理和细胞计数方法同前。

1.7 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS10.0 统计软件进行单因素方差分析,两两平均数间的多重比较,采用 Student *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异达到显著水平。

2 结果

2.1 低密度脂蛋白对内皮细胞基质细胞衍生因子 1 表达的影响

如图 1 所示,LDL 促进血管内皮细胞 SDF-1 的

表达。在对照组中, SDF-1 mRNA 的表达量很低, 随着 LDL 的浓度的增加, SDF-1 的 mRNA 表达量明显增加, 150 mg/L 组比 50 mg/L 组 mRNA 表达量增加约 3 倍。

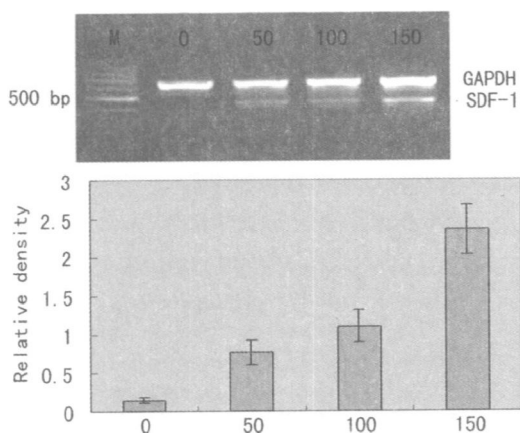


图 1. 低密度脂蛋白对基质细胞衍生因子 1 mRNA 表达的影响 M 为 PCR 标准品, 0 为对照组, 50 为 50 mg/L 组, 100 为 100 mg/L 组, 150 为 150 mg/L 组。

2.2 低密度脂蛋白对内皮细胞基质细胞衍生因子 1 蛋白表达的影响

对照组内皮细胞几乎没有 SDF-1 蛋白的表达, 在 50 mg/L 组即有明显的 SDF-1 蛋白表达, 随着 LDL 浓度的增加, 内皮细胞 SDF-1 蛋白表达量明显增加 (图 2)。

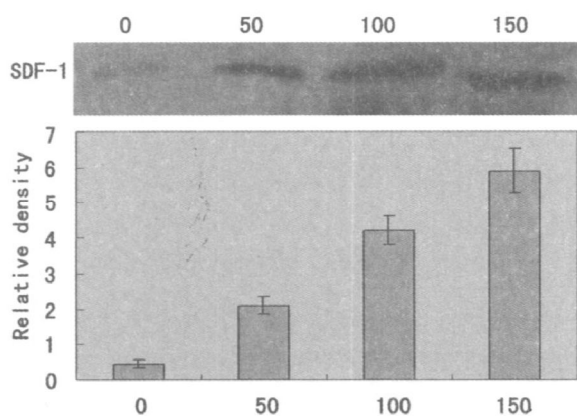


图 2. 低密度脂蛋白对内皮细胞基质细胞衍生因子 1 蛋白表达的影响 0 为对照组, 50 为 50 mg/L 组, 100 为 100 mg/L 组, 150 为 150 mg/L 组

2.3 低密度脂蛋白孵育内皮细胞对内皮单核细胞粘附的影响

低密度脂蛋白 (LDL) 促进内皮细胞与单核细胞粘附的作用随浓度增大而增强。当 LDL 浓度为 50 mg/L、100 mg/L 和 150 mg/L 时, 每个视野粘附的单核

细胞数分别为 60 ± 20 、 97 ± 26 和 170 ± 32 , 而对照组为 20 ± 5 , 差异有极显著性意义 ($P < 0.01$)。

2.4 基质细胞衍生因子 1 抗体对低密度脂蛋白作用的干预

基质细胞衍生因子 1 (SDF-1) 抗体对 LDL 引起的单核细胞粘附有明显的抑制作用。当 SDF-1 抗体的浓度为 0.1 mg/L、0.5 mg/L 和 1 mg/L 时, 粘附单核细胞数分别为粘附单核细胞数分别为 113 ± 23 、 53 ± 21 、 41 ± 10 , 均低于 LDL 对照组的 186 ± 31 , 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

血管内皮细胞对于维持血管正常的生理状态具有重要意义, 研究表明内皮细胞功能受到损害或被扰乱都可能影响 As 的发生发展, 内皮细胞表达粘附分子并与单核细胞发生粘附是内皮细胞功能受损而处于激活状态的表现之一, 也是 AS 发生的重要步骤。临床及流行病学研究显示血浆 LDL 水平升高是导致动脉硬化的重要因素。Stary 等^[5]对早期动脉粥样硬化损害的组织形态学研究表明, 胆固醇及其它脂质在血管壁内的沉积是动脉粥样硬化整个进程中的初发事件。这些脂体沉积物主要源于血液中的脂蛋白, 特别是 LDL。LDL 对内皮细胞功能起着重要的调节作用, 高浓度的 LDL 能诱导内皮细胞的功能失调, 损害内皮细胞的功能^[6]。当内皮受损时, 内皮细胞受到炎症介质刺激, 释放细胞粘附分子以及单核细胞趋化蛋白 1 和单核细胞聚集刺激因子, 促使单核细胞粘附于内皮表面。本研究观察到, 正常内皮细胞对单核细胞的粘附水平极低, 当加入 LDL 培养 24h 后, 单核/内皮细胞的粘附率显著增加, 说明 LDL 促进单核-内皮细胞的粘附。

在本实验中发现, LDL 能诱导内皮细胞表达基质衍生因子 1 (stromal derived factor-1, SDF-1)。SDF-1 是 CXC 家族趋化蛋白, 1988 年由日本学者 Nishikawa 等首先克隆发现, 其受体为 CXCR-4, 属 G 蛋白偶联受体家族。SDF-1 与 CXCR-4 作用, 构成 SDF-1/CXCR-4 反应轴, 转导特定的信号、介导不同的效应。过去认为, SDF-1/CXCR-4 轴介导的效应主要包括参与胚胎、血管、心脏形成以及 B 细胞生成等生理过程, 与炎症反应无关。近年来的研究报告显示 SDF-1/CXCR-4 轴在多种状态下发挥独特作用: 具有强烈的趋化作用, 并能促进 MCP-1 和 IL-8 的表达^[7], 介导炎症细胞跨膜迁移、对 T 淋巴细胞增殖起共刺激作用、并能促进 T 细胞与内皮细胞的粘附^[8],

参与慢性炎症发生。研究发现, SDF-1 在内皮细胞中表达, 并且内皮细胞、单核细胞和平滑肌细胞中也有 SDF-1 的受体 CXCR-4 的表达。研究表明, 在血管受到损伤后, SDF-1 能促进血管平滑肌祖细胞的募集, 促进血管重塑和新内膜形成^[9]。并且近来有文献报道, SDF-1/CXCR-4 在斑块内有高表达^[10]。我们采用 RT-PCR 和 Western blotting 方法检测了不同的 LDL 浓度下, SDF-1 的表达差异。发现在正常情况下内皮细胞几乎不表达 SDF-1, 当用不同浓度的 LDL 孵育内皮细胞后, 随着 LDL 浓度的增加, SDF-1 的表达量明显增加, 并且具有剂量依赖性, 而用 SDF-1 抗体干预后, LDL 诱导的单核细胞与内皮细胞的粘附明显减弱。已有文献研究表明因与 IL8 具有较高的同源性, SDF-1 也被称为 IL8 样因子, 与 IL8 存在很多功能上的相似之处。最近有研究发现 IL-8 对新鲜、游离的外周血单核细胞有趋化作用, 并且能促使单核细胞在内皮细胞上的滚动变为强有力的粘附。同时, SDF-1 与 Fractalkine 亦有高的同源性, 而 Fractalkine 对细胞粘附作用是不依赖于整合素(integrin)的新途径, 这提示着我们 SDF-1 可能具有粘附分子的活性, 可能通过依赖于整合素和不依赖于整合素的两条途径起作用, 促进单核细胞在活化的内皮细胞上的粘附, 为单核细胞进一步迁移到内皮下激活为巨噬细胞创造了条件, 进而促进动脉硬化的发生和发展。

总之, 在本研究中, LDL 处理组较对照组内皮细胞 SDF-1 的表达明显增加, 并且具有浓度依赖性, 用 SDF-1 抗体干预后, LDL 诱导的单核细胞与内皮细

胞的粘附数量明显减少, 表明 SDF-1 在 LDL 所致的单核细胞粘附密切相关。因此进一步研究明确 SDF-1 参与早期动脉硬化的发生发展, 对于预防和控制动脉硬化的发生和发展将具有重要意义。

[参考文献]

- [1] ybulsky MI, Lichtman AH, Hajra L, Iiyama K. Leukocyte adhesion molecules in atherogenesis [J]. *Clin Chim Acta*, 1999, 286 (1): 207-281
- [2] Spijkers PP, da Costa Martins P, Westein E, Gahnberg CG, Zwaginga JJ, Lenting PJ. LDL-receptor-related protein regulates beta2 integrin-mediated leukocyte adhesion [J]. *Blood*, 2005, 105 (1): 170-177
- [3] 唐朝克, 杨永宗, 易光辉, 王燕, 危当恒, 王佐. 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1 在 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇流出中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19 (8): 1 084-088
- [4] Kim JA, Berliner JA, Nadler JL. AngiotensinII increase monocyte binding to endothelial cells [J]. *J Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 226 (3): 862-868
- [5] Sary HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults [J]. *Arteriosclerosis*, 1989, 9 (Suppl 1): 119-132
- [6] 欧志君, 区景松, 马虹, 苏诚坚, Kirkwood A, Pritchard Jr. L-4F 和 SC-4F 在细胞培养中预防低密度脂蛋白诱导内皮功能失调的比较[J]. *中华心血管病杂志*, 2005, 33 (5): 411-414
- [7] Melchionna R, Porcelli D, Mangoni A, Carlini D, Liuzzo G, Spinetti G, et al. Laminar shear stress inhibits CXCR4 expression on endothelial cells: functional consequences for atherogenesis [J]. *FASEB J*, 2005, 19 (6): 629-631
- [8] Kantele JM, Kurk S, Jutia MA. Effects of continuous exposure to stromal cell-derived factor-1 alpha on T cell rolling and tight adhesion to monolayers of activated endothelial cells [J]. *J Immunol*, 2000, 164 (10): 5 035-040
- [9] Zernecke A, Schober A, Bot I, von Hundelshausen P, Liehn EA, Mopps B, et al. SDF-1 alpha/CXCR4 axis is instrumental in murine neointimal hyperplasia and recruitment of smooth Muscle progenitor cells [J]. *Circ Res*, 2005, 96 (2): 245-263
- [10] Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, Sukhova GK, Libby P, Luster AD. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques [J]. *Circ Res*, 2000, 86 (2): 131-138

(此文编辑 胡必利)