

# CCR5 亲和短肽对单核细胞趋化性的影响

王芳宇<sup>1</sup>, 曹朝晖<sup>2</sup>

(1. 衡阳师范学院生命科学系, 湖南省衡阳市 421008; 2. 南华大学生命科学学院, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 趋化因子受体 CCR5; 短肽; 单核细胞; RANTES

[摘要] 目的 探讨 CCR5 亲和短肽对单核细胞趋化活性的影响。方法 采用流式细胞仪观察短肽对单抗 2D7 与单核细胞结合的影响; Quantikine Human RANTES 试剂盒检测短肽与 RANTES 对单核细胞的竞争性结合作用; 体外趋化性实验观察短肽对单核细胞的趋化作用; 大鼠体内实验观察短肽对动脉粥样硬化形成的影响。结果 短肽能抑制 2D7 与单核细胞的结合; 也能竞争性抑制 RANTES 与单核细胞的结合, 其 IC<sub>50</sub> 约为 5.6 mg/L (3.98 μmol/L)。在体外, 短肽对单核细胞没有趋化性 ( $P=0.074$ ), 且能抑制 RANTES 对单核细胞的趋化作用, 短肽+RANTES 组的穿膜细胞数 ( $23 \pm 10$ ) 显著少于 RANTES 组 ( $62 \pm 13$ )。体内实验结果表明, 短肽能降低单核细胞在大鼠主动脉弓部位的聚集 ( $P<0.05$ )。结论 短肽对单核细胞具有很强的亲和作用, 且短肽能抑制单核细胞对 RANTES 的趋化性, 因而可降低或延缓动脉粥样硬化进程。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Effects of CCR5-Binding Peptide on Chemotaxis of Monocyte

WANG Fang-Yu, and CAO Zhao-Hui

(1. Department of Life Science, Hengyang Normal University, Hengyang 421008; School of Life Science, Nanhua University, Hengyang 421001)

[KEY WORDS] CC Chemokine receptor 5; Peptide; Monocyte; RANTES; Chemotaxis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of peptide specific to CCR5 on monocyte chemotaxis. **Methods** The effects of peptide on the binding of mAb 2D7 to monocyte were surveyed by flow cytometry; Competitive binding of peptide and RANTES on monocyte was measured through Quantikine Human RANTES kit; Chemotaxis assay of monocyte toward peptide was performed in vitro; Effects of peptide on atherosclerosis formation was detected in vivo in mice. **Results** Peptide could inhibit the binding of 2D7 and RANTES to monocyte (IC<sub>50</sub> was about 3.98 μmol/L). In vitro, peptide showed no chemotactic effect to monocyte ( $P=0.074$ ) and could inhibit chemotactic activity of monocyte toward RANTES, the cell number of migration in the peptide+RANTES groups ( $23 \pm 10$ ) was lower than that of the RANTES groups ( $62 \pm 13$ ). Peptide could impair the influx of monocyte to the aortic root in mice ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Peptide could target to monocyte and suppress chemotactic activity of monocyte toward RANTES and reduce atherosclerosis.

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)发生发展过程中的重要早期事件,此过程受多种因素,主要是粘附分子(如 VCAM-1<sup>[1]</sup>)和趋化因子(如 MCP-1、MIP-1α 和 RANTES 等<sup>[2]</sup>)的影响。其中 RANTES(regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted)可由多种类型细胞所分泌,如内皮细胞、MC、平滑肌细胞、活化 T 细胞、巨嗜细胞和血小板等<sup>[3]</sup>, RANTES 的受体主要是 CCR5(CC chemokine receptor 5)和 CCR2,而 CCR5 主要表达于静息 T 淋巴细胞、MC、巨嗜细胞、小胶质细胞和成熟的树突细胞<sup>[4]</sup>,以及内皮细胞<sup>[5]</sup>等。RANTES 通过与其受体 CCR5 相互作用,

从而介导 MC 等的迁移。本文采用 CCR5 亲和短肽,研究其对 RANTES 与 MC 亲和能力的影响,并研究其在体内外对 MC 趋化性的影响,为进一步研究该短肽在 As 中的作用提供一个初步依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

Quantikine Human RANTES kit、PE-2D7 和藻红蛋白(phycoerythrin, PE)标记的抗人 CCR5 单抗,为美国 R&D System 公司产品; RANTES, 分子质量 7.8 kDa, 英国 Pepro Tech EC 公司产品; 8 μm 的 Polycarbonate 膜为美国 Neuro Probe 公司产品; 流式细胞仪(BD FACS Vantage SE), 美国 BD 公司产品。

### 1.2 CCR5 亲和短肽(AFDWTFVPSLIL)

参照文献[6],短肽由上海生工生物工程技术有限公司采用固相法合成,经 HPLC 纯化,并经质

[收稿日期] 2006-03-21 [修回日期] 2006-05-08

[基金项目] 湖南省教育厅科学研究基金项目(00C156)资助

[作者简介] 王芳宇,博士,副教授,主要从事趋化因子及其受体的分子生物学研究,联系电话为 0734-8486763, E-mail 为 fangyu\_wang@hotmail.com。曹朝晖,硕士,副教授,研究方向为心血管疾病的分子机制, E-mail 为 caozhaohui72@sina.com。

谱确认。短肽(AFDWTFVPSLIL)溶解于DMSO中配成10 g/L,用PBS溶液稀释。

### 1.3 人血单核细胞的分离与鉴定

参照文献[2],采用淋巴细胞分离液分离新鲜健康人血单个核细胞层,置于血浆包被的塑料平皿内,37℃温育后,弃未贴壁的细胞,收集贴壁的MC,用Giemsa及非特异性酯酶染色鉴定,用0.4%台盼蓝染色试验MC的存活率。

### 1.4 短肽对2D7结合单核细胞的影响

单核细胞(MC)用PBS(含0.5% BSA)缓冲液洗3次,然后将细胞悬浮于相同PBS液中( $4 \times 10^9$ 个/L),取25  $\mu$ L细胞液(约 $1 \times 10^5$ 细胞)转移至5 mL FACS管;加入短肽(终浓度10 mg/L)到FACS管,4℃孵育30 min,然后每管加入10  $\mu$ L PE-2D7,并于4℃孵育40 min;PBS液洗两次以除去未结合的抗体,重新悬浮细胞于500  $\mu$ L PBS液中,流式细胞仪观察。

### 1.5 短肽与RANTES对CCR5的竞争性结合

将MC转移到96孔板(约 $1 \times 10^6$ /孔),于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养过夜;第二天,去掉培养基,RANTES(10 ng)和不同浓度的短肽溶液被加入到96孔板,37℃保温1 h;离心5 min后,含RANTES的上清液用Quantikine Human RANTES kit检测。

### 1.6 趋化实验

参照文献[7],趋化小室的下室每孔放27  $\mu$ L待测样品,上室每孔放入浓度为 $1 \times 10^9$ /L的MC悬液50  $\mu$ L(约 $5 \times 10^4$ 个细胞),在上、下室之间放置孔径为8  $\mu$ m的Polycarbonate膜。37℃、5% CO<sub>2</sub>孵育4 h后将膜取出,刮去膜上表面沉降的细胞,保留膜下表面的细胞,甲醛固定,Gimsa染色,计数高倍(400倍)视野下穿膜的细胞数,实验重复3次。

### 1.7 短肽对大鼠主动脉壁部位单核细胞的影响

24只大鼠(雄性,15周龄,购自中山大学实验动物中心)随机分为对照组、高血脂组、高血脂+短肽组(短肽每次200  $\mu$ g,两天一次),每组8只。高脂饲料配方为4%胆固醇,1%胆酸,0.5% 2-巯尿嘧啶,94.5%基础饲料。给食量按体重50 g/(kg·d),对照组只给基础饲料,持续喂养4周后用于实验。

### 1.8 统计学分析

数据分析采用SPSS10.0统计软件包,进行t检验, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 单核细胞的鉴定

台盼蓝染色实验,MC的存活率大于90%。Gi-

emsa和非特异性酯酶染色,MC纯度大于78%。

### 2.2 短肽对单克隆抗体2D7结合单核细胞的抑制

短肽AFDWTFVPSLIL与MC一起孵育,然后分别加入PE标记的抗人CCR5单克隆抗体2D7,经流式细胞仪观察并采用CellQuest软件分析。结果如图1所示,图中b为加入单抗2D7后的荧光强度曲线,c为加入短肽和单抗2D7后的荧光强度曲线。从图1可见,短肽的加入使荧光曲线向左移动(曲线c与b相比),即荧光强度降低;可能是短肽加入后,与MC上的CCR5发生了结合,造成2D7与CCR5的结合减少,故而荧光强度降低。此结果表明短肽对2D7与MC的结合具有明显的抑制作用。

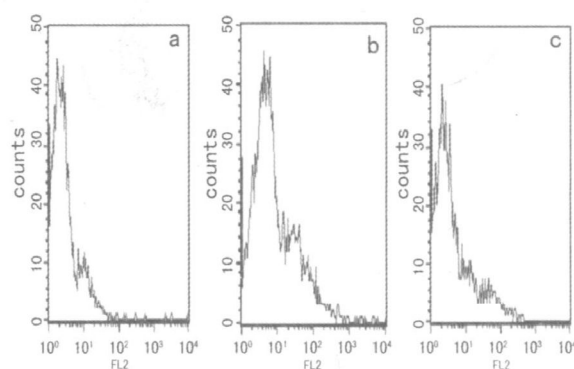


图1. 短肽对单克隆抗体2D7结合单核细胞的抑制

### 2.3 短肽对RANTES与CCR5结合的抑制

竞争性结合实验发现(图2),短肽对趋化因子RANTES与MC的结合具有明显的抑制作用,随着短肽浓度的提高,RANTES与MC的结合率降低,且呈剂量依赖性,其IC<sub>50</sub>约为5.6 mg/L (3.98  $\mu$ mol/L),即短肽与MC上CCR5的亲和力(K<sub>d</sub>)约为3.98  $\mu$ mol/L。

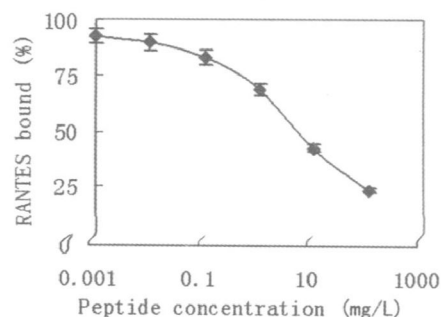


图2. 短肽对RANTES结合单核细胞的抑制

### 2.4 短肽对单核细胞趋化作用的抑制

用短肽(600  $\mu$ g/L)作用MC4 h,对照组不加药。将游离的Polycarbonate膜取下,在显微镜下计数穿过膜的细胞数。短肽组穿膜细胞数为 $18 \pm 8$ ,与对

照组( $14 \pm 5$ )相比,穿膜细胞数的差异没有显著性( $P > 0.05$ ),说明短肽对 MC 没有趋化作用。而与 RANTES 组( $62 \pm 13$ )比较,穿膜细胞数的差异有极显著性统计学意义( $P < 0.001$ );预先经短肽处理的 MC(短肽+RANTES 组)的穿膜细胞数( $23 \pm 10$ )则显著少于 RANTES 组( $P < 0.001$ ),说明短肽能够抑制 MC 对 RANTES 的趋化作用。

## 2.5 短肽对主动脉壁单核细胞迁移的影响

采用 1.3 的方法对大鼠主动脉弓部位分离的 MC 用流式细胞仪进行计数,结果发现,在高血脂+短肽给药组大鼠主动脉弓分离的 CCR5 阳性 MC 数(阳性细胞占 23%)显著少于高血脂组(阳性细胞占 44%)( $P < 0.05$ ),而与对照组(阳性细胞占 21%)没有明显差别( $P > 0.05$ )。由于短肽能对由 RANTES 引起的 MC 趋化性存在抑制作用,因而推测短肽可能抑制了 MC 向大鼠主动脉弓部位的迁移。

## 3 讨论

动脉粥样硬化(As)病变的初期特点是泡沫细胞集聚成簇,而血液 MC 嵌入动脉内皮下间隙是 As 中最早事件。随后 MC 被激活并分化为巨嗜细胞,巨嗜细胞通过 ox-LDL 受体和清道夫受体吞噬 ox-LDL,而此种吞噬不受细胞内胆固醇总量反馈调节,故导致了细胞内胆固醇堆积,最后形成 MC 源性泡沫细胞<sup>[8]</sup>。如果抑制血液 MC 向动脉内皮下间隙的迁移,则可降低或延缓 As 的形成。MC 活动受多种趋化因子调节,这种调节是通过 MC 表达的趋化因子受体来介导的。

在趋化因子中,与 As 最相关的、现时研究最多的是 MCP-1。Boring 等<sup>[9]</sup>发现,在载脂蛋白 E<sup>-/-</sup>中,CCR2(MCP-1 的受体)的缺失虽对血浆脂类和脂蛋白浓度无影响,但显著减少了 As 的形成。Sica 等<sup>[10]</sup>报道,LPS 可引起人 MC 上 CCR2 mRNA 水平快速下降,而这种下降同 MCP-1 的结合和趋化性反应减少有关。近年来,也有学者对 RANTES 及其受体与 As 的关系进行了研究。Veillard 等<sup>[11]</sup>研究发现 Met-RANTES 能减少 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠淋巴细胞向血管内膜的浸润,从而降低了 As 损伤的形成。van Wanrooij 等<sup>[12]</sup>采用 CCR5 拮抗剂 TAK-779(一种 HIV 进入抑制剂)处理 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠,结果发现 TAK-779 虽不能减少血清胆固醇的含量,但可以通过阻止 Th1 T 细胞向动脉粥样硬化部位的迁移而降低 As 的形成。

实验发现,短肽(AFDWTFVPSLIL)能抑制 2D7 与 MC 的结合,2D7 是抗人 CCR5 抗体,因而这种抑制应是通过短肽与 2D7 竞争性结合 MC 上的 CCR5 来实现的,这与以前的实验结果基本一致<sup>[6]</sup>。实验结果还证明,短肽也能抑制趋化因子 RANTES 与 MC 的结合,且这种抑制随短肽浓度的升高而呈剂量依赖性。在体外趋化性实验中,短肽的加入能明显降低 RANTES 对 MC 的趋化,且短肽对 MC 基本上没有趋化作用(与对照组比较  $P > 0.05$ )。在用大鼠进行的体内实验中,高血脂+短肽给药组与高血脂组相比,其主动脉弓部位的 MC 数量明显减少,显示短肽在体内也能对 MC 的趋化起抑制作用,从而可降低或延缓大鼠的 As 进程。有关短肽对 As 的影响及其机制我们将进行进一步的研究。

## [参考文献]

- [1] Cybulsky MI, Gimbrone MJ. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis [J]. *Science*, 1991, **251** (4995): 788-791
- [2] 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 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (4): 281-284
- [3] Hayes IM, Jordan NJ, Towers S, Smith G, Paterson JR, Earnshaw JJ, et al. Human vascular smooth muscle cells express receptors for CC chemokines [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18** (3): 397-403
- [4] Blanpain C, Doranz BJ, Bondué A, Govaerts C, De Leener A, Vassart G, et al. The core domain of chemokines binds CCR5 extracellular domains while their amino terminus interacts with the transmembrane helix bundle [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278** (7): 5 179-187
- [5] Berger O, Gan X, Gajuluva C, Burns AR, Sulur G, Stins M, et al. CXC and CC chemokine receptors on coronary and brain endothelia [J]. *Mol Med*, 1999, **5** (12): 795-805
- [6] 王芳宇,张添元,罗进贤,李瑞芳,甘菁菁,官文俊,等. 趋化因子受体 CCR5 亲和短肽的筛选 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32** (7): 636-641
- [7] Pilaro AM, Sayers TJ, McCormick KL, Reynolds CW, Wiltout RH. An improved in vitro assay to quantitate chemotaxis of rat peripheral blood granular lymphocytes (LGL) [J]. *J Immunol Meth*, 1990, **135** (1-2): 213-223
- [8] Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic [J]. *Nature*, 1998, **392** (9): 565-568
- [9] Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis [J]. *Nature*, 1998, **394** (6696): 894-897
- [10] Sica A, Saccani A, Borsatti A, Power CA, Wells TN, Luini W, et al. Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes [J]. *J Exp Med*, 1997, **185** (5): 969-974
- [11] Veillard NR, Kwak B, Pelli G, Mulhaupt F, James RW, Proudfoot AE, et al. Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice [J]. *Circ Res*, 2004, **94** (2): 253-261
- [12] van Wanrooij EJ, Happe H, Hauer AD, de Vos P, Imanishi T, Fujiwara H, et al. HIV entry inhibitor TAK-779 attenuates atherogenesis in low-density lipoprotein receptor deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (12): 2 642-647

(此文编辑 胡必利)