

基质细胞衍生因子 1 α 对大鼠血管平滑肌细胞与单核细胞粘附的影响

王佐^{1,2}, 吕运成¹, 危当恒^{1,2}, 姜志胜¹, 李国华¹, 姚峰¹, 刘录山^{1,2}, 王贵学²

(1. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001;

2. 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)

[关键词] 病理学与病理生理学; 基质细胞衍生因子 1 α ; 氧化型低密度脂蛋白; 血管平滑肌细胞; 单核细胞; 粘附; 大鼠

[摘要] 目的 探讨基质细胞衍生因子 1 α 对大鼠血管平滑肌细胞与单核细胞粘附的影响。方法 原代培养的大鼠血管平滑肌细胞与 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白孵育 48 h, 将单核细胞与平滑肌细胞共孵育后洗脱检测粘附功能, 并用基质细胞衍生因子 1 α 抗体阻断。结果 经氧化型低密度脂蛋白处理的血管平滑肌细胞基质细胞衍生因子 1 α 上调 5 倍, 单核细胞粘附增加 29 倍, 但可被基质细胞衍生因子 1 α 单抗所阻断。结论 基质细胞衍生因子 1 α 参与单核细胞与大鼠血管平滑肌细胞的粘附过程。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Stromal Cell-Derived Factor-1 α on Rat Vascular Smooth Muscle Cells/Monocytes Adhesion

WANG Zuo^{1,2}, LV Yun-Cheng¹, WEI Dang-Heng^{1,2}, JIANG Zhi-Sheng¹, LI Guo-Hua¹, YAO Feng¹, LIU Lu-Shan^{1,2}, and WANG Gui-Xue²

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

[KEY WORDS] Stromal Cell-Derived Factor 1 α ; Oxidized Low Density Lipoprotein; Vascular Smooth Muscle Cell; Monocytes; Adhesion; Rat

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) on rat vascular smooth muscle cells (VSMC) /monocytes adhesion. **Methods** VSMC was incubated with different concentrations of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL), SDF-1 α mRNA and protein expression were revealed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting. VSMC pretreated with 50 mg/L ox-LDL for 48 h were incubated with monocytes and SDF-1 α antibody to observe cells adhesion. **Results** Compared with control, SDF-1 α was upregulated to 5 times, VSMC supported 29 times higher arrest of monocytes, but this effect was obviously inhibited by the antibody to SDF-1 α . **Conclusion** SDF-1 α was implicated in VSMC/monocytes adhesion.

基质细胞衍生因子 1 α (stromal cell-derived factor-1 α , SDF-1 α) 是 P6 系小鼠骨髓基质细胞分泌的趋化因子, 根据其氨基酸序列含有 4 个保守的半胱氨酸及 N 端 2 个半胱氨酸被 1 个其他氨基酸隔开, 将其归为趋化因子 CXC 亚家族。它在细胞迁移、胚胎发育、介导免疫缺陷病毒感染中起重要作用^[1]。近年来 SDF-1 α 在动脉粥样硬化性疾病中的作用也开始引起重视^[2-4], 作为血管壁主要细胞成分的平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC), 在动脉粥样硬化性疾病的过程中起重要作用, 其是否表达 SDF-

1 α 以及 SDF-1 α 是否参与 VSMC 与血液单核细胞的粘附, 从而促进血管壁的炎症反应, 目前尚未见报道。本文通过研究 VSMC 经氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 处理后 SDF-1 α 表达变化及 SDF-1 α 对单核细胞与 VSMC 粘附的影响, 来进一步探讨 SDF-1 α 在血管壁炎症中所起的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

SD 大鼠 12 只, 由南华大学实验动物中心提供。单核细胞株 THP-1 购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所细胞库, 重组人 SDF-1 α 购于 R&D 公司, 羊抗鼠 SDF-1 α 一抗及兔抗羊二抗均购于武汉

[收稿日期] 2006-02-10 [修回日期] 2006-08-25

[基金项目] 第 38 批博士后基金 (# 2005038472)

[作者简介] 王佐, 博士后, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化发病的机制, E-mail 为 nb12@263.net。吕运成, 硕士, 研究方向为动脉粥样硬化发病的机制, E-mail 为 edward7907237@yahoo.com.cn。危当恒, 博士研究生, 从事动脉粥样硬化发病机制研究。

博士德,新鲜冰冻血浆购自衡阳市中心血站。胎牛血清购自北京元亨圣玛生物技术研究所,DMEM和RPMI1640购自Invitrogen公司。Trizol为Invitrogen公司产品,反转录试剂盒为Promega公司产品,2×Taq PCR MasterMix购自天为时代公司,其余试剂均为国产分析纯。

1.2 氧化型低密度脂蛋白的制备

将新鲜冰冻血浆解冻后作序列超速离心。首先4℃、42 000 r/min离心18 h,吸除极低密度脂蛋白和中密度脂蛋白,收集下层液体,加入溴化钾调整密度后再超离心(4℃、42 000 r/min)20 h,收集顶层橙黄色液体即得低密度脂蛋白。置10 μmol/L CuSO₄的PBS液,37℃温育透析24 h,用含100 μmol/L EDTA的PBS液室温透析24 h, PBS液4℃透析24 h,每8 h换液一次。过滤除菌,4℃保存。

1.3 血管平滑肌细胞的原代培养

将SD大鼠断头放血后,在无菌条件下迅速取出胸腹主动脉段,置于含Hank's液的小培养皿中漂洗3次,洗净后剥除外膜,纵行剖开血管,刮掉内膜,将剩余组织剪成1 mm×1 mm小块,种植于培养瓶壁。置于37℃、5% CO₂的培养箱中培养5~6 h后,加入含20%胎牛血清的DMEM培养基,再放回培养箱内静止培养,每3天换液一次。约10天后可见组织块长出细胞。

1.4 氧化型低密度脂蛋白对大鼠血管平滑肌细胞基质细胞衍生因子1α mRNA水平的影响

将不同浓度(0、2、10和50 mg/L) ox-LDL处理后的VSMC,按Trizol试剂盒说明书提取总RNA。然后取2 μg各组细胞总RNA逆转录合成cDNA,再取10 μL逆转录产物进行PCR循环。94℃温育5 min,94℃变性30 s→60℃复性30 s→72℃延伸30 s,共30个循环,末次循环72℃延伸10 min。SDF-1α上游引物为5'-GGA CGC CAA GGT CGT CGC CGT G-3',下游引物为5'-TCG GGT CAA TGC ACA C-3',产物长度为222 bp。β-actin上游引物为5'-AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC-3',下游引物为5'-CGA TAG TGA TGA CCT GAC CGT-3',产物长度为138 bp。反应结束后,取反应产物5 μL进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,UVP型凝胶图像分析系统摄图,并分析各组目的基因及β-actin基因灰度值,以二者的比值代表SDF-1α mRNA表达相对量。

1.5 氧化型低密度脂蛋白对大鼠血管平滑肌细胞基质细胞衍生因子1α蛋白水平的影响

在收获好的细胞中加入去污剂裂解缓冲液裂解细胞,于4℃离心10 min,弃除沉淀。取16 μL蛋白

质溶液加入5×SDS凝胶加样缓冲液中,在100℃加热10 min以使蛋白质变性。用15% SDS聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,转PVDF膜,丽春红染色观察转移效果,并确定蛋白质分子质量标准位置。封闭液封闭2 h,按1:200加入羊抗鼠SDF-1α抗体,4℃培育过夜,TBST洗三次,1:2 000加入辣根过氧化物酶标记兔抗羊二抗,室温培育1 h,TBST洗三次,用Western印迹荧光检测试剂盒显示于X光片。结果用Labwork凝胶图像分析系统对胶片扫描,获取各条带的光密度值。

1.6 氧化型低密度脂蛋白对血管平滑肌细胞与单核细胞粘附的影响

参考Kim等^[5]的方法,先将VSMC接种于6孔板,待长成单层后,移去普通DMEM培养基加入含不同浓度ox-LDL的DMEM培养基,于细胞培养箱内孵育48 h,抗体封闭组于最后1 h加入SDF-1α抗体。然后移去培养基,加入THP-1细胞,每孔4×10⁴个,37℃孵育30 min,移去培养基,用PBS轻轻洗涤3遍,去除未粘附细胞,倒置显微镜下计数每个视野粘附的单核细胞数。每个孔计数上、下、左、右、中5个视野,平均后即得每个视野粘附单核细胞数。

1.7 统计学处理

实验所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析及t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 氧化型低密度脂蛋白对血管平滑肌细胞与单核细胞粘附的影响

血管平滑肌细胞在未经ox-LDL处理时粘附的单核细胞甚少(10.7±2.2个/视野),但经ox-LDL刺激后粘附的细胞数目明显增加(图1),且呈浓度依赖性。其中2 mg/L ox-LDL就可使粘附的单核细胞数目显著增加(28.3±2.4个/视野, $P < 0.05$),10和50 mg/L ox-LDL组粘附的细胞数目更多,差异有显著性(分别为127.0±1.9个/视野和291.9±3.6个/视野, $P < 0.01$),以50 mg/L ox-LDL组粘附的细胞数最多,与对照组相比,其粘附的细胞数目增加了29倍。

2.2 氧化型低密度脂蛋白处理后血管平滑肌细胞基质细胞衍生因子1α mRNA、蛋白表达变化

在没有ox-LDL刺激情况下,培养的大鼠VSMC就有少量的SDF-1α mRNA(0.17±0.02)、蛋白(4.99±0.19)表达,随着ox-LDL浓度的升高,SDF-1α mRNA、蛋白表达亦逐渐上调。其中2 mg/L ox-LDL就可

使 VSMC SDF-1 α mRNA (0.38 ± 0.04) 和蛋白 (7.28 ± 0.24) 显著上调 ($P < 0.05$), 10 和 50 mg/L ox-LDL 组 SDF-1 α mRNA (分别为 0.59 ± 0.02 和 0.81 ± 0.09)、蛋白 (分别为 8.44 ± 0.35 和 15.19 ± 0.52) 上调更明显, 差异有显著性 ($P < 0.01$), 以 50 mg/L ox-LDL 组上调作用最大, 与对照组相比, 其上调 5 倍以上 (图 2 和图 3)。

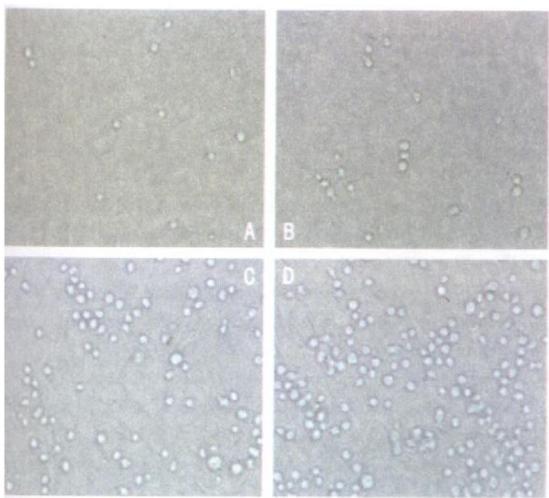


图 1. 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对血管平滑肌细胞与单核细胞粘附的影响 A 为 0 mg/L 组, B 为 2 mg/L 组, C 为 10 mg/L 组, D 为 50 mg/L 组。

2.3 基质细胞衍生因子 1 α 抗体对血管平滑肌细胞与单核细胞粘附的抑制

与阳性对照组 (197.92 ± 3.46 个/视野) 比, 当加

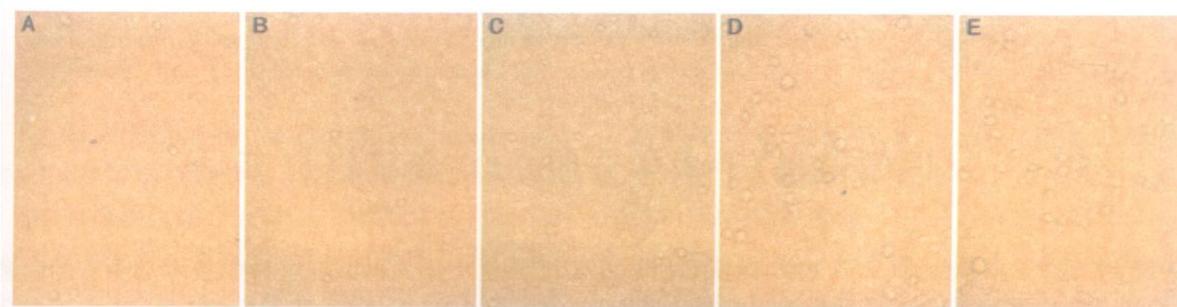


图 4. 基质细胞衍生因子 1 α 抗体对 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白处理后的平滑肌细胞与单核细胞粘附的影响 A 为 0 mg/L 氧化型低密度脂蛋白组, B 为 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白 + 1 μ g/L 抗体组, C 为 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白 + 0.1 μ g/L 抗体组, D 为 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白 + 0.01 μ g/L 抗体组, E 为 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白组。

3 讨论

Abi-Younes 等^[2] 采用免疫组织化学及免疫蛋白印迹法检测到 SDF-1 α 仅在斑块中高表达, 并确认其主要在平滑肌细胞、内皮细胞等中表达, 而正常动脉壁中未见表达。Andreas 等^[3] 在载脂蛋白 E 基因缺

陷鼠动脉内膜损伤后恢复覆盖的过程中亦检测到 SDF-1 α 高表达, 并用双荧光染色法证实其表达绝大部分位于平滑肌细胞。Hideyasu 等^[4] 在小鼠模型因移植排斥反应而出现动脉粥样硬化病灶中检测到 SDF-1 α 表达上调。本文在培养的大鼠原代 VSMC 中检测到极低水平的 SDF-1 α 表达, 可能是由于体内环

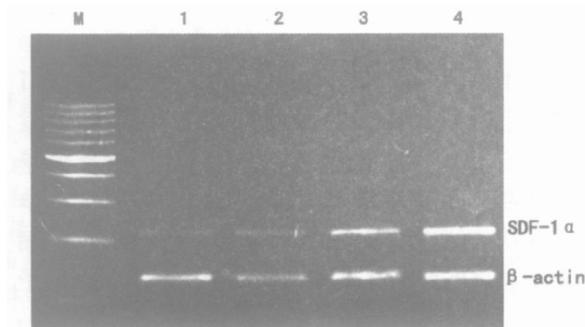


图 2. 氧化型低密度脂蛋白处理后血管平滑肌细胞基质细胞衍生因子 1 α mRNA 表达变化 1 为 0 mg/L 组, 2 为 2 mg/L 组, 3 为 10 mg/L 组, 4 为 50 mg/L 组。

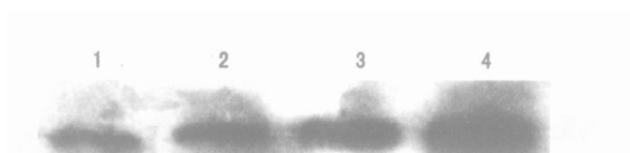


图 3. 氧化型低密度脂蛋白处理后血管平滑肌细胞基质细胞衍生因子 1 α 蛋白表达变化 1 为 0 mg/L 组, 2 为 2 mg/L 组, 3 为 10 mg/L 组, 4 为 50 mg/L 组。

陷鼠动脉内膜损伤后恢复覆盖的过程中亦检测到 SDF-1 α 高表达, 并用双荧光染色法证实其表达绝大部分位于平滑肌细胞。Hideyasu 等^[4] 在小鼠模型因移植排斥反应而出现动脉粥样硬化病灶中检测到 SDF-1 α 表达上调。本文在培养的大鼠原代 VSMC 中检测到极低水平的 SDF-1 α 表达, 可能是由于体内环

境与培养条件的差异导致细胞基因表达谱改变,但经 ox-LDL 处理后 SDF-1 α 表达明显上调。

上调的 SDF-1 α 可能参与了炎症细胞的募集。本文经 ox-LDL 处理后平滑肌细胞与单核细胞的粘附较对照组明显增加,用 SDF-1 α 单抗可明显抑制二者的粘附且呈浓度依赖性。危当恒等^[6]用低密度脂蛋白处理内皮细胞株 ECV304 24 h 后亦发现内皮细胞与单核细胞的粘附明显增加,且其粘附同样可被 SDF-1 α 单抗抑制。这说明虽然有许多粘附分子参与单核细胞的募集,但是 SDF-1 α 在其中的作用不可忽视。但在动物试验中 Andreas 等^[3]和 Ute 等^[7]发现给予 SDF-1 α 单抗的鼠模型单位面积病变区内单核细胞与对照组差异无显著性,但 Ute 等^[7]证实单位面积病变区内淋巴细胞却明显减少。这样单核细胞募集在体实验与体外细胞实验所获得的结果相矛盾,但目前已有多篇文献证实单核细胞上有 SDF-1 α 受体 CXCR4 表达,SDF-1 α 在体内募集单核细胞到底发挥多大作用有待进一步研究。

募集的炎症细胞参与血管壁的炎症。募集到血管壁中的炎细胞可分泌大量的粘附分子、趋化因子、炎症因子如白细胞介素 1 β 、单核细胞趋化蛋白 1、转化生长因子、肿瘤坏死因子,从而介导病变局部细胞间免疫应答,促进血管壁炎症反应的发生发展^[8]。如果抑制炎症细胞的进入,血管壁炎症反应就会减轻,病变亦相应减轻。Andreas 等^[3]用抗体中和 SDF-1 α 可抑制内膜新生和肥大,Hideyasu 等^[4]给予 SDF-1 α 抗体后小鼠模型因移植排斥反应而出现动脉粥样硬化病灶面积明显减少、病变程度明显减轻,就是有力的例证。

综上所述,ox-LDL 可上调大鼠 VSMC 中 SDF-1 α 的表达,并增加平滑肌细胞与单核细胞的粘附,但可被 SDF-1 α 抗体所抑制,表明 SDF-1 α 与单核细胞募集密切相关。进一步探讨 SDF-1 α 在动物模型中与血管壁炎症细胞募集的关系,对预防和控制人类血管壁炎症性疾病包括动脉粥样硬化的发生发展将具有重要意义。

[参考文献]

- [1] 吕运成,王佐. 基质细胞衍生因子 1 α 及其特异受体 CXCR4 与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉粥样硬化杂志, 2005, 13(4): 523-525
- [2] 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*, 1999, 86: 131-138
- [3] Andreas S, Sandra K, Micheal L, Elisa AL, Christian W. Crucial role of stromal cell-derived factor-1 α in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Circ*, 2003, 108: 2491-497
- [4] Hideyasu S, Taro M, Kenichiro Y, Taku H, Manabu I, Sataru T, et al. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 interaction is critical for development of transplant arteriosclerosis [J]. *Circ*, 2004, 110: 2924-930
- [5] Kim J, Berlianer J, Nadler L. Angiotensin II increase monocyte binding to endothelial cells [J]. *J biochem Biophys Res Commun*, 1996, 226(3): 862-868
- [6] 危当恒,王贵,王佐,刘录山,吕运成,唐朝克. SDF-1 对 LDL 诱导单核/内皮细胞粘附的影响[J]. 中国动脉粥样硬化杂志, 2006, 14(5): 387-390
- [7] Ute Z, Andreas S, Michael L, Elisa AL, Wolfgang E, Neil E, et al. Neointimal smooth muscle cells display a proinflammatory phenotype resulting in increased leukocyte recruitment mediated by P-selectin and chemokines [J]. *Circ Res*, 2004, 94: 776-784
- [8] 杨永宗. 炎症学说[M]. 见: 杨永宗,阮长耿,唐朝枢主编. 动脉粥样硬化性心血管病基础与临床. 北京: 北京科技出版社, 2004; 50-51 (此文编辑 许雪梅)

•征订•

《医学信息》手术学分册 2007 年征订启事

《医学信息》手术学分册 (ISSN 1006-1959 CN 61-1278/R) 是由中华人民共和国科学技术部主管的国家级科技期刊,是中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊,中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊,中国期刊全文数据库全文收录期刊,中国期刊网、中国学术期刊(光盘版)全文收录期刊。主要栏目有:专家论坛,临床论著,短篇论著,经验交流,综述与讲座,研究生园地,新技术与新方法介绍,经验与教训,药物与临床,护理园地等。2007 年《医学信息》手术学分册的征订工作现已开始。本刊为月刊,国内外公开发行。每本定价 8 元(含邮资),全年定价 96 元。全国各地邮局均可办理征订,邮发代号: 55-88,编辑部也可直接办理订阅。

《医学信息》手术学分册编辑部地址: 河南省卫辉市健康路 88 号新乡医学院附属第一医院。

邮编: 453100; 电话: 0373-4402935; 传真: 0373-4402794; E-mail: yxxxss1987@126.com。