

[文章编号] 1007-3949(2007)15-01-0015-04

• 实验研究 •

基质细胞衍生因子 1 α —CXCR4 趋化 THP-1 细胞迁移及氧化型低密度脂蛋白的影响

吕运成^{1,2}, 王佐^{1,3}, 危当恒^{1,3}, 姜志胜¹, 万炜², 李国华¹, 童中艺¹, 王贵学³

(南华大学 1. 心血管病研究所, 2. 解剖学教研室, 湖南省衡阳市 421001;

3. 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 —CXCR4; 氧化型低密度脂蛋白; 单核细胞; 迁移

[摘要] 目的 探讨基质细胞衍生因子 1 α 对单核细胞趋化作用、氧化型低密度脂蛋白对基质细胞衍生因子 1 α 趋化单核细胞的影响及其对 THP-1 细胞表达 CXCR4 的影响。方法 用 Transwell 迁移实验检测基质细胞衍生因子 1 α 对单核细胞的趋化作用, 逆转录聚合酶链反应检测 CXCR4 mRNA 的表达, Western blot 检测 CXCR4 蛋白的表达, 并观察氧化型低密度脂蛋白对 THP-1 细胞 CXCR4 表达的剂量和时间效应。结果 基质细胞衍生因子 1 α 呈浓度依赖性诱导单核细胞迁移, 加入 CXCR4 抗体可明显抑制这种作用。经不同浓度氧化型低密度脂蛋白处理 48 h 后的 THP-1 细胞再用 10 μ g/L 基质细胞衍生因子 1 α 进行趋化时, 氧化型低密度脂蛋白呈浓度依赖性地增加单核细胞的迁移, 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白组迁移的细胞数是对照组的 11 倍。THP-1 细胞有基础水平的 CXCR4 表达, 50 mg/L 氧化型低密度脂蛋白可使 CXCR4 的表达上调 4~5 倍。CXCR4 上调最早在 6 h 内发生, 12 h 达峰值。结论 基质细胞衍生因子 1 α —CXCR4 参与趋化单核细胞迁移, 其作用被氧化型低密度脂蛋白加强; 氧化型低密度脂蛋白上调 CXCR4 表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Chemotactic Activity of Stromal Cell Derived Factor 1 α —CXCR4 to the Migration of THP-1 Cell and Enhanced Effect of Oxidized Low Density Lipoprotein

LV Yur-Cheng^{1,2}, WANG Zuo^{1,3}, WEI Dang-Heng^{1,3}, JIANG Zhi-Sheng¹, WAN Wei², LI Guo-Hua¹, TONG Zhong-Yi¹, and WANG Gui-Xue³

(1. Institute of Cardiovascular Disease, 2. The Anatomy Division, University of South China, Hengyang 421001, China; 3. Bioengineering College of Chongqing University and Key Lab for Biomechanics Tissue Engineering of Ministry of Education, Chongqing 400044, China)

[KEY WORDS] Stromal Cell Derived Factor 1 α —CXCR4; Oxidized Low Density Lipoprotein; Monocyte; Migration; Up Regulation; Chemotaxis

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of stromal cell derived factor 1 α —CXCR4 (SDF-1 α —CXCR4) on THP-1 cells chemotaxis, the influence of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) on THP-1 cells migration exposed to SDF-1 α , and the effect of ox-LDL on the expression of CXCR4 in THP-1 cell. **Methods** THP-1 cells chemotaxis was examined with transwell permeable supports. CXCR4 mRNA and protein was revealed by RT-PCR and Western blot respectively in THP-1 cells incubated with different concentrations/time of ox-LDL. **Results** SDF-1 α induced a pronounced migration of input cells in a concentration-related manner, but this effect was obviously inhibited by the antibody to CXCR4. After pretreated with different concentration of ox-LDL for 48 h, THP-1 cells were exposed to 10 μ g/L SDF-1 α , ox-LDL enhanced THP-1 cells migration in a concentration-dependent manner and 50 mg/L ox-LDL support 11 fold higher of cells migration. CXCR4 was constitutionally expressed in THP-1 cells. Compared with the control group, a four to five fold induction of CXCR4 occurred in THP-1 treated with 50 mg/L ox-LDL. The up-regulation effect was monitored within 6 h, it was peaked at 12 h, then followed with a decline, which mirrored the expression pattern of CXCR4 in monocyte. **Conclusions** SDF-1 α /CXCR4 is implicated in chemotaxis of THP-1 cell and chemotactic response of monocyte to SDF-1 α is enhanced by ox-LDL; ox-LDL up-regulates CXCR4 expression.

趋化因子是一类超家族的细胞因子。由于基

质细胞衍生因子 1 α (stromal cell derived factor 1 α , SDF-1 α) 靠近 N 端的两个半胱氨酸被一个其他的氨基酸隔开而被归为 CXC 亚家族。它的唯一受体是 CXCR4^[1]。最近的研究表明 SDF-1 α —CXCR4 在动脉粥样硬化斑块中高表达, 且 CXCR4 在动脉粥样硬化形成过程有关的主要细胞成分如单核细胞、淋巴细胞、内皮祖细胞、平滑肌祖细胞等中均有表达, 因此

[收稿日期] 2006-09-08 [修回日期] 2007-01-02

[基金项目] 第 38 批中国博士后基金(2005038472); 教育部重点科技基金(104158); 湖南省自然科学基金(06jj5051)

[作者简介] 吕运成, 硕士, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, E-mail 为 edward7907237@yahoo.com.cn。通讯作者王佐, 博士后, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制。危当恒, 博士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制。

SDF-1 α -CXCR4 与动脉粥样硬化的关系已经引起重视^[2]。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)的致动脉粥样硬化作用已经被公认。ox-LDL 进入内皮下,渗透到中层的平滑肌层,促进平滑肌细胞分泌大量 SDF-1 α 并释放进入血液,从而激发血液中的细胞往血管病变区域迁移,并最终到达内皮下。特别是单核细胞在变成巨噬细胞后吞噬大量脂质而成为泡沫细胞,同时释放出多种细胞因子和炎症介质进一步促进病变的发展。

本研究探讨 SDF-1 α 对单核细胞趋化作用、ox-LDL 对 SDF-1 α 趋化单核细胞的影响及其对 THP-1 细胞表达 CXCR4 的影响。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

Transwell 迁移系统与六孔板购于 Corning 公司;人单核细胞株 THP-1 购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所;RPMI1640 培养基购自 Invitrogen 公司;胎牛血清购自北京元亨圣玛生物技术研究所;牛血清白蛋白购自上海生工生物工程有限公司;SDF-1 α 购自 R&D 公司;CXCR4 抗体购自 Santa Cruz 公司;新鲜冰冻血浆购自衡阳市中心血站。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养及分组

THP-1 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养,处理前所有细胞换用含 2% 牛血清白蛋白的 RPMI1640 培养基,同时加入 0、2、10 及 50 mg/L ox-LDL 处理 48 h 或加入 50 mg/L ox-LDL 处理 0、6、12、24 及 48 h。

1.3 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,4℃、42 000 r/min 离心 18 h,收集下层液体,加入溴化钾调整密度后再 4℃、42 000 r/min 离心 20 h,收集顶层橙黄色液体即得低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)。置 10 μ mol/L CuSO₄ 的 PBS 液中,37℃透析 24 h,用含 100 μ mol/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。

1.4 Transwell 迁移实验检测基质细胞衍生因子 1 α 趋化单核细胞迁移

单核细胞迁移采用 8 μ m 孔径的 Transwell 迁移系统^[3]。THP-1 细胞均匀悬于含 0.5% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,然后加到上室(细胞密度为 2×10^8 个/L)。在下室加入重组的 SDF-1 α 和含 0.5%

胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,37℃孵育 10 h 后取出上室,在 300 \times 显微镜下连续计数 4 个视野的细胞数,取其平均值。在一些试验中,需提前用 CXCR4 抗体封闭 THP-1 细胞 1 h 后再加到上室。

1.5 逆转录聚合酶链反应检测 CXCR4 mRNA

将 ox-LDL 处理后的细胞,按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA。取 2 μ g 各组细胞总 RNA 逆转录合成 cDNA,再取 10 μ L 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。CXCR4 引物序列上游 5'-CTG AGA AGC ATG ACG GAC AA-3',下游 5'-TGG AGT GTG ACA GCT TGG AG-3',PCR 扩增产物长度 492 bp。GAPDH 引物序列上游 5'-TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG-3',下游 5'-TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG-3',PCR 扩增产物长度为 697 bp。反应结束后,取反应产物 5 μ L 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内参 GAPDH 基因灰度值,以二者的比值代表 CXCR4 mRNA 的相对含量。

1.6 Western blot 检测 CXCR4 蛋白

在收集的细胞中加入三去污剂裂解缓冲液裂解细胞,4℃离心 10 min,弃除沉淀。取 16 μ L 加入 5 \times SDS 凝胶加样缓冲液中,100℃加热 10 min。用 10% 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,并确定蛋白质分子量标准位置。封闭液封闭 2 h,按 1:400 加入羊抗人 CXCR4 一抗,4℃孵育过夜,TBST 洗 3 次,1:2000 加入辣根过氧化物酶标记的兔抗羊二抗,室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次,用免疫印迹荧光检测试剂盒激发荧光,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。

1.7 统计学分析

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析和 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基质细胞衍生因子 1 α 趋化 THP-1 细胞迁移

基质细胞衍生因子(SDF) 1 α 呈浓度依赖性趋化 THP-1 细胞迁移,1 μ g/L SDF-1 α 组与对照组比较就有统计学差异,100 μ g/L SDF-1 α 组趋化的细胞数是对照组的 38 倍。当加入抗体封闭 CXCR4 1 h 后,可明显抑制 SDF-1 α 对 THP-1 的趋化作用(表 1 和图 1)。

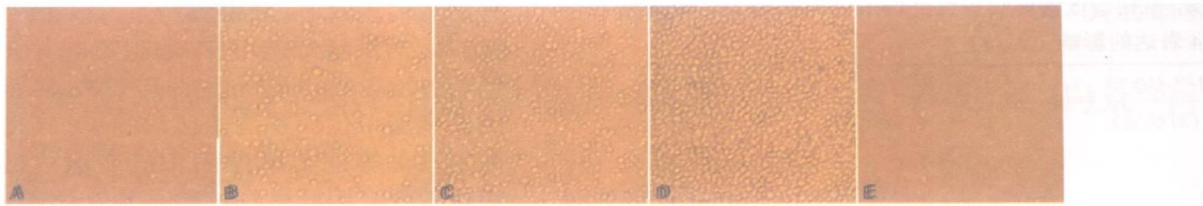


图 1. 基质细胞衍生因子 1α 趋化 THP-1 细胞迁移及 CXCR4 对其的影响 A 为 0 μg/L SDF-1α 组, B 为 1 μg/L SDF-1α 组, C 为 10 μg/L SDF-1α 组, D 为 100 μg/L SDF-1α 组, E 为 100 μg/L SDF-1α+ 2 mg/L CXCR4 组。

表 1. 基质细胞衍生因子 1α 趋化 THP-1 细胞迁移及 CXCR4 对其的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	迁移的细胞数
0 μg/L SDF-1α (对照组)	8.00 ± 2.06
1 μg/L SDF-1α	32.56 ± 5.34 ^a
10 μg/L SDF-1α	77.89 ± 10.42 ^a
100 μg/L SDF-1α	308.22 ± 21.88 ^b
100 μg/L SDF-1α+ 2 mg/L CXCR4	6.75 ± 1.91

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.001$, 与对照组比较。

2.2 氧化型低密度脂蛋白对基质细胞衍生因子 1α 趋化 THP-1 细胞的影响

氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)呈浓度依赖性增强 SDF-1α 对 THP-1 细胞的趋化作用, 10 mg/L ox-LDL 组和 50 mg/L ox-LDL 组趋化的细胞数分别是对照组的 4 倍和 11 倍(表 2 和图 2)。

表 2. 氧化型低密度脂蛋白对基质细胞衍生因子 1α 趋化 THP-1 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s$)

ox-LDL 浓度 (mg/L)	迁移的细胞数
0 (对照组)	14.00 ± 1.00
2	18.20 ± 2.17
10	57.80 ± 6.61 ^a
50	159.20 ± 13.48 ^a

a 为 $P < 0.001$, 与对照组比较。

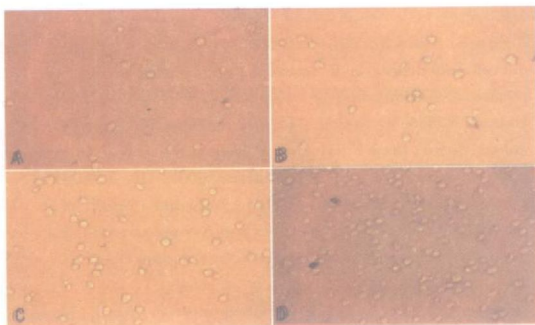


图 2. 氧化型低密度脂蛋白对基质细胞衍生因子 1α 趋化 THP-1 细胞的影响 A 为 0 mg/L ox-LDL 组, B 为 2 mg/L ox-LDL 组, C 为 10 mg/L ox-LDL 组, D 为 50 mg/L ox-LDL 组。

2.3 氧化型低密度脂蛋白处理 THP-1 细胞后 CXCR4 的表达

THP-1 细胞 CXCR4 有基础水平表达。随 ox-LDL 浓度增加, CXCR4 的表达逐渐上调, 2 mg/L ox-LDL 就具有显著上调 CXCR4 的作用, 50 mg/L ox-LDL 组约为对照组的 5 倍(表 3 和图 3)。50 mg/L ox-LDL 与 THP-1 细胞孵育不同时间, 6 h 内 CXCR4 表达上调, 12 h 出现一个峰值, 约为基础水平的 4 倍, 随后逐渐回落, 但 48 h 的表达水平仍显著高于 0 h(表 4 和图 4)。

表 3. 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对 THP-1 细胞 CXCR4 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

ox-LDL 浓度 (mg/L)	mRNA	蛋白
0 (对照组)	0.21 ± 0.01	1.83 ± 0.13
2	0.42 ± 0.03 ^a	4.57 ± 0.28 ^a
10	0.60 ± 0.02 ^a	6.27 ± 0.26 ^a
50	0.91 ± 0.05 ^b	9.26 ± 0.45 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.001$, 与对照组比较。

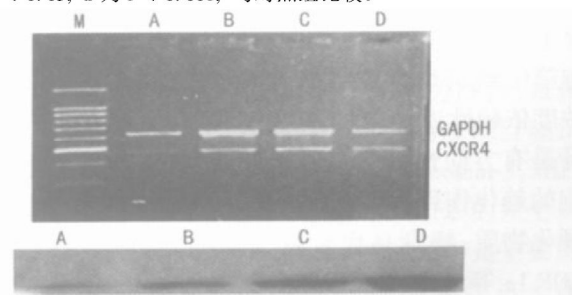


图 3. 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对 THP-1 细胞 CXCR4 表达的影响 上图为 mRNA 的表达, 下图为蛋白的表达; A 为 0 mg/L 组, B 为 2 mg/L 组, C 为 10 mg/L 组, D 为 50 mg/L 组。

3 讨论

目前动物实验研究发现 SDF-1α/CXCR4 与动脉粥样硬化性疾病密切相关联^[2]。Abi-Younes 等^[4]采用免疫组织化学及 Western blot 检测到 SDF-1α 仅在斑块中高表达, 而正常动脉壁中未见表达。Andreas

表 4. 氧化型低密度脂蛋白处理不同时间对 THP-1 细胞 CXCR4 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

时间 (h)	mRNA	蛋白
0 (对照组)	0.19 ± 0.02	0.73 ± 0.07
6	0.53 ± 0.05 ^a	3.84 ± 0.40 ^a
12	0.58 ± 0.02 ^b	5.41 ± 0.21 ^b
24	0.40 ± 0.04 ^a	4.23 ± 0.36 ^a
48	0.35 ± 0.07 ^a	4.55 ± 0.47 ^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.001$, 与对照组比较。

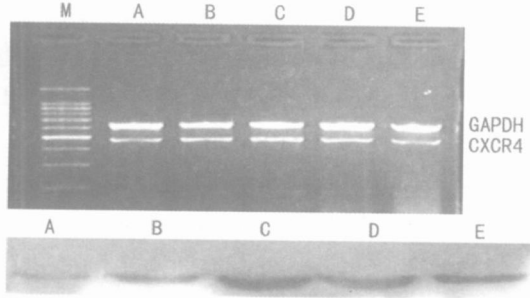


图 4. 氧化型低密度脂蛋白处理不同时间对 THP-1 细胞 CXCR4 表达的影响 上图为 mRNA 的表达, 下图为蛋白的表达; A 为 0 h 组, B 为 6 h 组, C 为 12 h 组, D 为 24 h 组, E 为 48 h 组。

等^[5]在载脂蛋白 E^{-/-} 鼠动脉内膜损伤后恢复覆盖的过程中亦检测到 SDF-1 α 的高表达。Hideyasu 等^[6]在小鼠模型因移植排斥反应而出现的动脉粥样硬化病灶中检测到 SDF-1 α -CXCR4 表达上调。本研究在 THP-1 细胞中检测到极低水平的 CXCR4 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的改变,但经 ox-LDL 处理后 CXCR4 表达明显上调。上调的 SDF-1 α -CXCR4 将粘附的炎症细胞趋化到病灶部位发挥重要作用。SDF-1 α 不仅呈浓度依赖性诱导单核细胞迁移,更重要的是这种诱导是有方向性的。ox-LDL 可增强 SDF-1 α 对单核细胞的趋化作用,而 ox-LDL 是一种强烈的致动脉粥样硬化物质,特别是血管壁受损时,它可以通过增强 SDF-1 α 等趋化因子对炎症细胞的趋化活性,使炎症细胞被趋化到病灶,从而促进或加重血管壁的炎症病变。

另外,我们在用 Transwell 做趋化分析时发现, SDF-1 α 对单核细胞及 ox-LDL 处理后的单核细胞有趋化作用,但单核细胞用佛波酯处理变成巨噬细胞, SDF-1 α 就没有趋化作用了。进一步发现, SDF-1 α 对吞噬 ox-LDL 而泡沫化的 THP-1 细胞也不具有促迁移作用。如果是这样,就可以解释为什么单核细胞一旦迁移到内皮下后,要从内皮下再迁移出来就十

分困难的现象了,其很可能是 SDF-1 α 的浓度梯度和 SDF-1 α 对巨噬细胞/泡沫细胞不起趋化作用的综合结果。Andreas 等^[5]和 Ute 等^[7]发现给 SDF-1 α 单抗的鼠模型单位面积病变区内的单核细胞较对照组无差别,Ute 等证实单位面积病变区内的淋巴细胞却明显减少。因此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 的表达,所以 SDF-1 α 在体内募集单核细胞中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、趋化因子及炎症因子,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。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^[5]和 Zernecke 等^[8]用抗体中和 SDF-1 α 可抑制内膜的新生和肥大,Hideyasu 等^[6]给予 SDF-1 α 抗体后小鼠模型因移植排斥反应而出现的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。

总之,本研究从细胞水平证明了 SDF-1 α -CXCR4 与单核细胞迁移密切相关,其作用被 ox-LDL 加强;且 ox-LDL 上调 CXCR4 表达。因此,进一步探讨 SDF-1 α -CXCR4 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病变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] Rollins BJ. Chemokines [J]. *Blood*, 1997, **90** (3): 909-928.
- [2] 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]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (4): 523-525.
- [3] Ravindra BK, William JH, Irfan IG, Christine M, Alison DS, Sergio AL, et al. CCL11 (Eotaxin) induces CCR3-dependent smooth muscle cell migration [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24**: 1 211-216.
- [4] Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, Sukhova GK, Libby P, Luster AD, et al. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques [J]. *Circulation Research*, 1999, **86**: 131-138.
- [5] 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]. *Circulation*, 2003, **108**: 2 491-497.
- [6] 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]. *Circulation*, 2004, **110**: 2 924-930.
- [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] Zernecke A, Schober A, Bot I, von Hundelshausen P, Liehn E, Mopps B, et al. SDF-1 α /CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells [J]. *Circ Res*, 2005, **96**: 784-791.

(此文编辑 文玉珊)