

[文章编号] 1007-3949(2008)16-07-0523-04

• 实验研究 •

基质细胞衍生因子 1 α 通过上调 CXCR4 表达 促进单核-内皮细胞粘附

田国平¹, 李国华², 邹正生³, 曾均发¹, 王佐³, 涂玉林³

(南华大学 1. 附属第二医院, 2. 船山学院, 3. 心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 氧化型低密度脂蛋白; 基质细胞衍生因子 1 α ; CXCR4; 粘附; 动脉粥样硬化; CXCR4 抗体[摘要] 目的 研究基质细胞衍生因子 1 α 对 CXCR4 表达及 THP-1 单核细胞与内皮细胞粘附的影响。方法 逆转录聚合酶链反应检测 CXCR4 mRNA 的表达, 免疫印迹检测其蛋白表达变化; 用 0、50、100 和 200 μ g/L 基质细胞衍生因子 1 α 处理内皮细胞 30 min 后, 将 THP-1 单核细胞与内皮细胞共孵育后洗脱检测 THP-1 与内皮细胞的粘附, 并加用 10 mg/L 的 CXCR4 抗体阻断。结果 100 μ g/L 基质细胞衍生因子 1 α 显著上调 THP-1 单核细胞上 CXCR4 的表达 ($P < 0.05$), 基质细胞衍生因子 1 α 能促进内皮细胞与 THP-1 单核细胞的粘附, 且随着作用浓度的增加粘附细胞数也增加, 但可被 CXCR4 抗体所抑制。结论 基质细胞衍生因子 1 α 可上调 THP-1 单核细胞上 CXCR4 表达, 并能促进单核细胞与内皮细胞粘附, 其机制与上调单核细胞 CXCR4 表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Pro-Adhesive Effect of Stromal Cell Derived Factor 1 Alpha on Monocyte/Endothelium Related to the Expression of CXCR4

TIAN Guo-Ping¹, LI Guo-Hua², ZOU Zheng-Sheng³, ZENG Jun-Fa¹, WANG Zuo³, and TU Yu-Lin³

(1. The Second Affiliated Hospital, 2. Chuan Shan College, 3. Institute of Cardiovascular Disease, University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Oxidized Low Density Lipoprotein; Stromal Cell Derived Factor 1 Alpha; CXCR4; Adhesion; Atherosclerosis; Antibody of CXCR4

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of stromal cell derived factor 1 alpha (SDF-1 α) on CXCR4 expression in THP-1 monocyte, and the effect of SDF-1 α and CXCR4 antibody on monocyte/endothelium adhesion. **Methods** CXCR4 mRNA and protein expressions were detected by RT-PCR and Western blotting respectively in monocyte pretreated with 100 μ g/L of SDF-1 α for 0 and 30 min. ECV-304 endothelial cells pretreated with 0, 50, 100 and 200 μ g/L SDF-1 α for 30 minutes and sub-cultured with THP-1 cells, with or without CXCR4 antibody (10 mg/L), THP-1/ECV-304 adhesion was observed. **Results** CXCR4 was constitutively expressed in THP-1 cells and increased remarkably by 100 μ g/L SDF-1 α for 30 min. THP-1 and ECV-304 adhesion was enhanced by 50~200 μ g/L SDF-1 α , but it was also apparently inhibited by the CXCR4 antibody ($P < 0.05$).**Conclusions** SDF-1 α enhances CXCR4 expression in THP-1 cells. SDF-1 α enhances monocyte/endothelium adhesion, which is related to up-regulating CXCR4 expression.

单核细胞在血管壁上的粘附与聚集被认为是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的始动环节。危等^[1]最近发现低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)可以促进内皮细胞与单核细胞粘附, 其机制与其促进内皮细胞表达基质细胞衍生因子 1 α (stromal cell derived factor 1 alpha, SDF-1 α)有关。吕运成等^[2]又发现 SDF-1 α 参与单核细胞与血管平滑肌细胞(vascular

smooth muscle cell, VSMC)的粘附过程, SDF-1 α 抗体可以抑制它们之间的粘附。SDF-1 α 参与了单核细胞与内皮细胞或平滑肌细胞的粘附过程, 其机制未明, 故本研究旨在探索 SDF-1 α 促粘附作用的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

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细胞库, 人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 购自中国上海典型物培养中心; DMEM 和 RPMI1640 培养基购自 GIBCO 公司, HEPES 购自北京利科生物化学有限公司; 胎牛血清购自北

[收稿日期] 2008-05-07 [修回日期] 2008-07-06

[基金项目] 中国博士后基金(2005038472); 湖南省自然科学基金(07jj3034); 湖南省教育厅课题(07C617)

[作者简介] 田国平, 硕士, 副主任医生, 研究方向为动脉粥样硬化发病的机制, E-mail 为 pgtian555@hotmail.com。通讯作者王佐, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化分子标记及药物筛选平台建设, E-mail 为 nb12@263.net。邹正生, 硕士, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化病因发病及防治。

京元亨圣玛生物技术研究所,临用时经 56℃水浴 30 min 灭活, -20℃保存;牛血清白蛋白与胰蛋白酶购自上海生工。新鲜冰冻血浆购自衡阳市中心血站;重组人 SDF-1 α 购自美国 PEPROTEHEC 公司;CXCR4 抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔的二抗均购自武汉博士德公司;总 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司;AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒购自 Promega 公司;2 \times Taq PCR MasterMix 和 100 bp DNA Ladder 购自北京天为时代公司;BlueRanger 预染蛋白分子质量标准,BCA 蛋白含量测定试剂为 Hyclone Pierce 公司;Western blot 发光试剂为北京中山中桥产品;SDF-1、CXCR4 和 GAPDH(作为内参)引物均由上海生物工程公司合成;丙二醛检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 细胞培养及处理

人脐静脉内皮细胞株 ECV-304,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37℃、5% CO₂ 培养箱中静置培养,培养基中加 10 mmol/L 的 HEPES、1.0 \times 10⁵ u/L 的青霉素和 100 mg/L 的链霉素,第 3~5 代细胞用于实验。用无血清 DMEM 培养基培养 24 h 使细胞同步化,然后换用含 2% 牛血清白蛋白的 DMEM,同时加入不同浓度氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 孵育。THP-1 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基于 37℃、5% CO₂ 培养箱中静置培养,培养基中加 10 mmol/L 的 HEPES、1.0 \times 10⁵ u/L 的青霉素和 100 mg/L 的链霉素,取对数生长期细胞进行实验。用无血清 RPMI1640 培养基培养 24 h 使细胞同步化,然后换用含 2% 牛血清白蛋白的 RPMI1640,同时加入 CXCR4 抗体孵育。

1.3 逆转录聚合酶链反应

用 Trizol RNA 抽提液提取细胞总 RNA, RNA 浓度以紫外分光光度计(重复 3 次, A₂₆₀ nm/A₂₈₀ nm 比值在 1.8 以上方可用。取 1.0 μ g 总 RNA 为模板,以 Oligo(dT) 16 为引物逆转录合成 cDNA,再取逆转录产物 1 μ L 进行 PCR 循环。95℃温育 5 min, 94℃变性 45 s \rightarrow 52℃复性 45 s \rightarrow 72℃延伸 1 min, 共 32 个循环,末次循环 72℃延伸 10 min。SDF-1 α 的引物序列为上游 5'-TTG ACC CGA AGC TAA AGT-3', 下游 5'-CAG GGC ATG GAT GAA TAT-3', 产物长度为 283 bp; CXCR4 的引物序列为上游 5'-CCA GAA GAA ACT GAG AAG-3', 下游 5'-AGA TGA AGT CGG GAA TAG-3', 产物长度为 326 bp; GAPDH 的引物序列为上游 5'-TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG-3', 下游

5'-TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG-3', 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,UV 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 SDF-1 α 和 CXCR4 mRNA 的相对含量。

1.4 Western 印迹

在收获好的内皮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,BCA 法进行蛋白质定量。或收集单核细胞,经 PBS 洗涤 3 次,于悬浮缓冲液中裂解后,4℃离心 10 min,小心吸出上清液,BCA 法进行蛋白定量。取提取的蛋白质样品(35 μ g 总蛋白量/泳道)加入适量 5 \times 上样缓冲液和 10% β -巯基乙醇,100℃煮 10 min,8% SDS-PAGE 电泳(积层胶 60 mV,分离胶 120 mV)后电转移(100 mA 2 h 或 60 mA 3 h)至 PVDF 膜上,丽春红染色观察蛋白质转移情况。5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,1:400 加入 SDF-1 α 一抗或 CXCR4 一抗 4℃孵育过夜, TBST 洗涤 30 min,每 10 min 换液 1 次。1:1000 加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h, TBST 洗涤 30 min,每 10 min 换液 1 次。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,以对照组面积灰度值为 100% 与实验组进行比较和半定量分析。

1.5 单核细胞与内皮细胞粘附实验

参考 Kim 等^[3]的方法,先将血管内皮细胞接种于 6 孔板,待细胞长到差不多平铺板子后,移去普通 DMEM 培养液加入不同浓度(0、50、100 和 200 μ g/L) SDF-1 α 的 DMEM 培养液,于细胞培养箱内孵育 30 min,抗体封闭组于最后 30 min 加入 10 mg/L CXCR4 抗体。然后移去培养液,加入等体积的 THP-1 细胞,37℃孵育 30 min,移去培养液,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,方法为每个孔计数上、下、左、右、中 5 个视野,取平均值得到每个视野粘附细胞数。

1.6 统计学处理

采用 SPSS11.0 统计软件对数据进行分析。实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析及 *t* 检验。

2 结果

2.1 基质细胞衍生因子 1 α 对单核细胞 CXCR4 表达的影响

在正常的 THP-1 单核细胞上存在 CXCR4,用

100 $\mu\text{g/L}$ SDF-1 α 孵育 THP-1 单核细胞 30 min, CXCR4 mRNA (0.66 ± 0.03 比 0.37 ± 0.02 , $P < 0.05$) 和蛋白 (1.98 ± 0.37 比 1.00 ± 0.15 , $P < 0.05$) 表达均比对照组明显上调(图 1)。

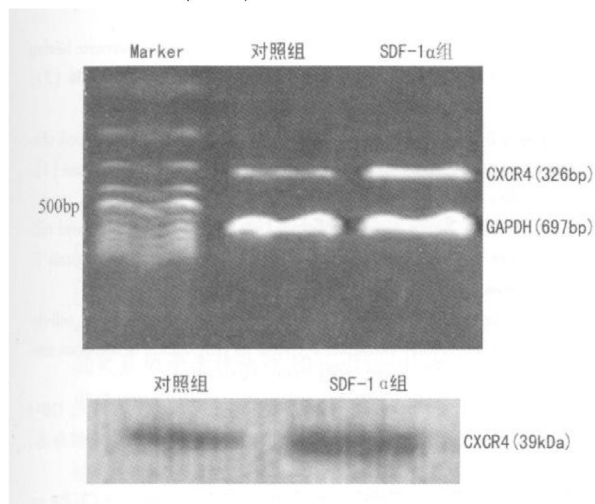


图 1. 基质细胞衍生因子 1 α 对 CXCR-4 mRNA(上图) 和蛋白(下图) 表达的影响

2.2 基质细胞衍生因子 1 α 促进单核细胞与内皮细胞粘附

在 50~200 $\mu\text{g/L}$ 范围内, SDF-1 α 可明显促进 THP-1 单核细胞与内皮细胞粘附(图 2), 且随着 SDF-1 α 浓度增加而增加(表 1), 50 $\mu\text{g/L}$ SDF-1 α 促粘附能力是空白对照组的 2.2 倍, 200 $\mu\text{g/L}$ SDF-1 α 促粘附能力是空白对照组的 3 倍。在 SDF-1 α 的基础上加入 10 mg/L CXCR4 抗体, 可明显抑制 SDF-1 α 促粘附作用($P < 0.05$)。

表 1. 基质细胞衍生因子 1 α 及 CXCR4 抗体对单核细胞与内皮细胞粘附的影响

分组	粘附细胞数(个/视野)
空白对照组	100 \pm 7
50 $\mu\text{g/L}$ SDF-1 α	223 \pm 9 ^a
100 $\mu\text{g/L}$ SDF-1 α	268 \pm 6 ^a
200 $\mu\text{g/L}$ SDF-1 α	301 \pm 10 ^a
100 $\mu\text{g/L}$ SDF-1 α + 10 mg/L CXCR4 抗体	173 \pm 11 ^{ab}
10 mg/L CXCR4 抗体	95 \pm 6

a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 100 $\mu\text{g/L}$ SDF-1 α 组比较。

3 讨论

近年来研究表明 SDF-1 α /CXCR4 轴与动脉粥样硬化关系密切。在人的冠状动脉粥样硬化斑块中检测到 SDF-1 α 高表达, 主要表达在内皮细胞、平滑肌

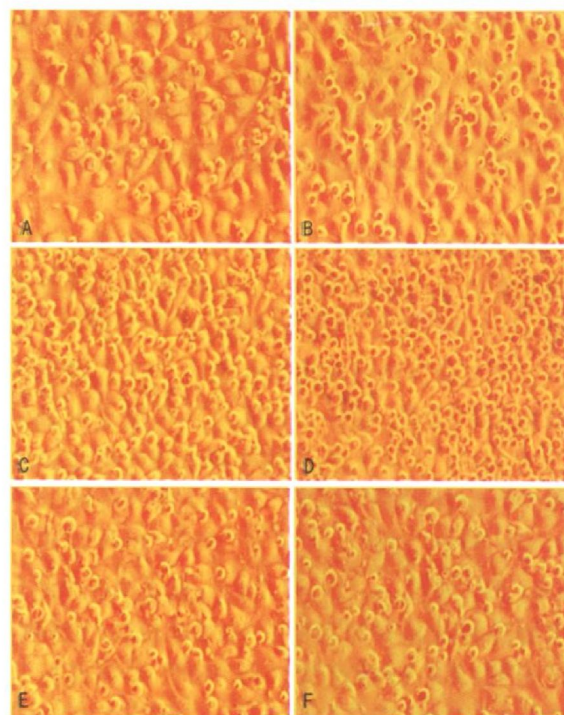


图 2. 基质细胞衍生因子 1 α 及 CXCR4 抗体对单核细胞与内皮细胞粘附的影响

A 为空白对照组, B 为 50 $\mu\text{g/L}$ SDF-1 α 组, C 为 100 $\mu\text{g/L}$ SDF-1 α 组, D 为 200 $\mu\text{g/L}$ SDF-1 α 组, E 为 100 $\mu\text{g/L}$ SDF-1 α + 10 mg/L CXCR4 抗体组, F 为 10 mg/L CXCR4 抗体组。

细胞和巨噬细胞, 而正常动脉壁中未见表达^[4]。SDF-1 α 表达在载脂蛋白 E 基因敲除鼠动脉内膜损伤后形成的新生内膜中, 双色荧光标记证实其主要表达在新生内膜的平滑肌细胞^[5]。在小鼠胸主动脉同种异体移植模型中, 发现移植物的动脉粥样硬化病灶中 SDF-1 α /CXCR4 高表达^[6]。SDF-1 α 在正常的内皮细胞几乎不表达, 用 LDL 处理人脐静脉内皮细胞株 ECV-304, 可上调内皮细胞 SDF-1 α 的表达^[11]。ox-LDL 可刺激大鼠血管平滑肌细胞 SDF-1 α 表达^[7]。

氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)能刺激内皮细胞产生大量的 SDF-1 α , 在内皮细胞表面以膜结合的形式形成浓度梯度。而血液中众多的细胞均有 SDF-1 α 的特异性受体 CXCR4, 如单核细胞、淋巴细胞、血小板和造血干细胞等。当 SDF-1 α 与 CXCR4 结合时, 这使得血液中的单核细胞、淋巴细胞、血小板和造血干细胞等更有利于与内皮细胞粘附, 趋化到内皮下。特别是粘附的单核细胞在变成巨噬细胞后大量吞噬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来进一步促进病变的发展。用 LDL 处理细胞株 ECV-304 24 h 后亦发现该细胞株与单核细胞的粘附明显增加, 且其粘附可被 SDF-1 α 单抗抑

制^[1]。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^[2]。本实验发现,经不同浓度 SDF-1 α 处理的内皮细胞与单核细胞的粘附作用明显增强,SDF-1 α 促粘附作用可被 CXCR4 抗体所抑制。

基质细胞衍生因子 1 α (SDF-1 α) 通过上调 CXCR4 的表达促进炎性细胞粘附。SDF-1 α 处理前列腺癌细胞 PC-3 后,PC-3 上的 CXCR4 表达上调^[8];用 SDF-1 α 处理后的前列腺癌细胞 PC-3 与人脐静脉内皮细胞粘附增强,用抗 CXCR4 抗体可显著抑制粘附,故 SDF-1 α 通过上调 CXCR4 的表达来促进 PC-3 粘附。本实验发现,ox-LDL 可以促进内皮细胞上 SDF-1 α 的表达,SDF-1 α 又可使 THP-1 单核细胞上 CXCR4 表达增强,ox-LDL 和 SDF-1 α 促进单核细胞与内皮细胞的粘附作用都能被 CXCR4 抗体所抑制。由此可见,SDF-1 α 能通过上调 THP-1 单核细胞上 CXCR4 表达来促进单核细胞与内皮细胞粘附。有研究^[9-11] 表明 SDF-1 α 与 CXCR4 结合后可激活整合素(如 LFA-1、VLA-4 和 VLA-5),促进 CD34⁺/CXCR4⁺ 细胞、淋巴细胞和肿瘤细胞与内皮细胞的粘附。

综上所述,SDF-1 α 能上调单核细胞 CXCR4 表达,促进单核细胞与内皮细胞的粘附作用,并能被 CXCR4 抗体所抑制,SDF-1 α 通过上调 THP-1 单核细胞 CXCR4 表达来促进单核细胞与内皮细胞粘附。

[参考文献]

- [1] 危当恒,王贵学,王佐,等. 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[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (5): 387-390.
- [2] 王佐,吕运成,危当恒,等. 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黏附的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (9): 759-762.
- [3] Kim J, Berlianer J, Nadler L, et al. Angiotensin II increase monocyte binding to endothelial cells [J]. *J Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 226 (3): 862-868.
- [4] Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, et al. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques [J]. *Circ Res*, 2000, 86: 131-138.
- [5] Andreas Schober, Sandra Knarren, Michael Lietz. Crucial role of stromal cell-derived factor-1 α in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Circulation*, 2003, 108: 2491-497.
- [6] Hideyasu Sakihama, Taro Masunaga, Kenichiro Yamashita. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 interaction is critical for development of transplant arteriosclerosis [J]. *Circulation*, 2004, 110: 2924-930.
- [7] 吕运成,王佐,危当恒,等. 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[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15 (1): 35-38.
- [8] Promil Kukreja, Asim B, Abdel-Mageed, et al. Up-regulation of CXCR4 expression in PC-3 cells by stromal-derived factor-1 (CXCL12) increases endothelial adhesion and transendothelial migration: role of MEK/ERK signaling pathway-dependent NF- κ B activation [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 9891-898.
- [9] Amnon Peled, Valentin Grabovsky, Liliana Habler, et al. The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34⁺ cells on vascular endothelium under shear flow [J]. *J Clin Invest*, 1999, 104: 199-211.
- [10] Natalia Wright, Andrés Hidalgo, José Miguel Rodríguez-Frade, et al. The chemokine stromal cell-derived factor-1 α modulates $\alpha_4\beta_7$ integrin-mediated lymphocyte adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule-1 and fibronectin [J]. *J Immunol*, 2002, 168: 268-277.
- [11] Cardones AR, Takashi Murakami, Hwang ST. CXCR4 enhances adhesion of B16 tumor cells to endothelial cells in vitro and in vivo via β_1 integrin [J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 751-757.

(此文编辑 许雪梅)

•读者•作者•编者•

关于 E-mail 投稿的要求及注意事项

本刊编辑部

由于网络的发展,E-mail 投稿已为越来越多的期刊编辑部采用,我刊也不例外。与传统信函邮寄投稿相比较,E-mail 投稿具有快捷、方便、直观等特点,且费用低廉。然而,在接受 E-mail 投稿过程中我们发现,稿件文本不一,格式各异。有些甚至直接将文章放在书写窗口内,经过传输,文章早已面目全非,又没有纸打印稿作对照,不知文章里写了些什么,尤其是当今计算机病毒肆虐,新的病毒层出不穷,一不小心染上病毒,整个文件就要被删除。为规范 E-mail 投稿,确保其安全性,我刊特作如下规定:

- 1、E-mail 投稿时,必须把文章作为附件发送,严禁将文章放在 E-mail 书写窗口内。
- 2、附件中的文章应为 Word 格式。书写时,进入 Word 界面后,应首先进入页面设置窗口设置页面,参数如下: 纸型为 A4; ④页边距上为 2.0 mm,下为 2.0 mm,左为 2.2 mm,右为 2.0 mm; ④文档网格为每行 45 个汉字,每页 40 行; 字体为中文宋体、常规、五号。然后点击选择其它参数,如“单倍行距”、“两端对齐”、“页面显示”等。
- 3、插图粘贴于正文相应位置中,表格直接在正文中绘制;标题与注释直接写于正文相应位置,严禁以文本框形式插入。
- 4、E-mail 投稿时,科研基金资助项目批准书的复印件和单位介绍信这两件不要扫描放入 E-mail 内,请另用信函形式邮寄编辑部,以方便存档。
- 5、请在 E-mail 附件内写明联系方式。