

## 9-顺式维甲酸抑制佛波酯诱导人单核细胞系 THP-1 向巨噬细胞分化

周磊<sup>1</sup>, 何奔<sup>1</sup>, 沈玲红<sup>1</sup>, 曾锦章<sup>2</sup>, 胡刘华<sup>1</sup>, 卜军<sup>1</sup>, 王力<sup>2</sup>

(1. 上海交通大学医学院附属仁济医院心内科, 上海市 200127; 2. 中国科学院上海生命科学研究, 上海市 200233)

[关键词] 内科学; 视黄醇类 X 受体; 单核细胞; 巨噬细胞; 动脉粥样硬化; 细胞分化

[摘要] 目的 探讨视黄醇类 X 受体特异性激动剂 9-顺式维甲酸对佛波酯诱导人单核细胞系 THP-1 向巨噬细胞分化的影响。方法 体外培养人单核细胞系 THP-1, 经佛波酯诱导分化为巨噬细胞, 同时给予 9-顺式维甲酸对佛波酯诱导分化进行干预, 通过相差显微镜观察细胞形态, MTT 比色法检测细胞贴壁率, 流式细胞仪检测与单核/巨噬细胞分化有关的细胞表面标志物 CD11b 和 CD36 的表达。结果 9-顺式维甲酸干预后梭形、分支状细胞明显减少, 与佛波酯单独作用组相比细胞贴壁率减少 50% ( $P < 0.01$ ), 细胞表面标志物 CD11b 和 CD36 分别减少 50% 和 28% ( $P < 0.01$ )。结论 视黄醇类 X 受体特异性激动剂 9-顺式维甲酸可明显抑制佛波酯诱导人单核细胞系 THP-1 向巨噬细胞分化。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## 9-cis Retinoid Acid Inhibits the Differentiation of THP-1 Human Monocyte Cell Line into Macrophage Induced by Phorbol 12-Myristate 13-Acetate

ZHOU Lei<sup>1</sup>, HE Ben<sup>1</sup>, SHEN Ling-Hong<sup>1</sup>, ZENG Jin-Zhang<sup>2</sup>, HU Liu-Hua<sup>1</sup>, BU Jun<sup>1</sup>, and WANG Li<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiology, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127; 2. Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China)

[KEY WORDS] Retinoid X Receptor; Monocytes; Macrophages; Atherosclerosis; Differentiation

[ABSTRACT] Aim To investigate the effect of 9-cis-retinoid acid (9-cisRA), a specific agonist of retinoid X receptors (RXR) on the differentiation of THP-1 human monocyte cell induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). Methods

Human monocyte cell line THP-1 was cultured and induced to macrophage by PMA treatment. The effect of 9-cisRA on the differentiation induced by PMA was studied. Cell morphology was observed by phase contrast microscope and the adhesion rate of THP-1 was detected by methyl thiazolyltetrazolium (MTT) assay. The cell surface markers involved in differentiation of monocyte/macrophage (CD11b, CD36) were analyzed by flow cytometry (FACS). Results

The metamorphic cells were decreased in 9-cisRA group. THP-1 cell adhesion rate was inhibited by 50% ( $P < 0.01$ ), and the cell surface markers (CD11b, CD36) were decreased by 50% and 28% ( $P < 0.01$ ) in 9-cisRA treated group. Conclusion

The specific agonist of RXR, 9-cisRA could effectively inhibit the differentiation of THP-1 human monocyte induced by PMA.

视黄醇类 X 受体 (retinoid X receptors, RXR) 作为细胞核内的公共异源二聚体搭档, 与其他核受体形成异源二聚体后转录激活下游基因, 在细胞凋亡与分化、胚胎发育、炎症、内环境稳定和代谢等生理过程中起重要作用<sup>[1,2]</sup>。多项研究证明在动脉粥样硬化中起主要作用的其他核受体家族成员, 如过氧

化体增殖物激活型受体 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)、肝脏 X 受体 (liver X receptor, LXR) 和胆汁酸 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 等, 均需与 RXR 结合形成异源二聚体 (PPAR/RXR、LXR/RXR、FXR/RXR) 后, 才能与靶基因启动子中的反应元件相作用而发挥生物学效应, 激活 RXR 可改善胰岛素抵抗、降低血糖和调节脂质代谢<sup>[3-6]</sup>, 从而达到抗动脉粥样硬化目的, 而 RXR 在动脉粥样硬化炎症反应方面的作用尚不清楚。本研究通过佛波酯体外刺激诱导人单核细胞系 THP-1 向巨噬细胞分化, 观察 RXR 特异性激动剂 9-顺式维甲酸 (9-cis-retinoid acid, 9-cisRA) 对佛波酯诱导的 THP-1 向巨噬细胞分化过程的影响, 以期进一步探讨 RXR 在动脉粥样硬化炎症方面的作用。

[收稿日期] 2008-07-09

[修回日期] 2008-09-12

[基金项目] 国家自然科学基金 (30670880 和 30600242); 上海市科委基础研究重点项目 (05JC14037 和 08XD1402600)

[作者简介] 周磊, 硕士, 医师, 主要从事心律失常治疗及核受体与单核/巨噬细胞分化的研究, E-mail 为 fatbutterfly-zhoulei@yahoo.com.cn。沈玲红, 博士, 副主任医师, 主要从事动脉粥样硬化性心血管疾病的基础和临床研究, E-mail 为 shenglinghong@medmail.com.cn。通讯作者何奔, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事急性心肌梗死再灌注治疗及核受体抗动脉粥样硬化机制研究, E-mail 为 heben@medmail.com.cn。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料和试剂

RPMI 1640 培养基和胎牛血清购自 Hyclone 公司。佛波酯、9-cisRA 和 MTT 购自 Sigma 公司。FITC 偶联的抗人 CD11b 单克隆抗体, FITC 偶联的抗人 CD36 单克隆抗体及相应的同型对照体购自 eBioscience 公司, 其他试剂为国产分析纯或进口分装。

### 1.2 细胞培养

THP-1 细胞购自 ATCC, 将 THP-1 细胞悬浮培养于 RPMI 1640 培养基(含 2 mol/L 谷氨酰胺, 15 mol/L HEPES, 1.0 mmol/L 丙酮酸钠,  $10^5$  u/L 青霉素, 100 mg/L 链霉素,  $5 \times 10^{-5}$  mol/L  $\beta$ -巯基乙醇和 10% 类胎牛血清)。细胞培养于 5% CO<sub>2</sub>、95% 空气培养箱, 每 2~3 d 传代一次, 使细胞密度保持在  $10^9 \sim 10^{10}$ /L 之间。生长良好的细胞换用 0.5% FBS RPMI 1640 培养基, 佛波酯(10、20 和 40 nmol/L) 诱导 THP-1 细胞向巨噬细胞分化, 同时加入不同浓度 RXR 特异性激动剂 9-cisRA 共同作用, 空白组加入 DMSO 作对照。培养 24~48 h 后, 按不同实验方法, 分别收集和保存实验材料, 通过相差显微镜(OLYMPUS, CKX31SF 型) 观察细胞形态改变并照相。

### 1.3 MTT 检测细胞贴壁率

采用 96 孔板接种细胞(细胞密度为  $6 \times 10^5$ /L, 0.5% FCS RPMI 1640 培养液), 不同浓度佛波酯诱导 THP-1 细胞向巨噬细胞分化, 同时加入 RXR 特异性激动剂 9-cisRA (1、10 和 100 nmol/L) 共同作用, 空白组加入 DMSO 作对照, 每个浓度组设 5 个复孔, 48 h 后轻柔地吸出上清液, 用 37℃ PBS 轻洗 3 次, 后加入 100  $\mu$ L MTT 溶液(0.5 g/L), 作用 4 h 弃去, 另加入 200  $\mu$ L DMSO, 振荡数分钟后酶标仪(波长 492 nm) 检测每孔吸光度(A) 值。

### 1.4 流式细胞仪检测细胞表面标志物 CD36 和 CD11b 表达

参照 eBioscience 公司流式细胞仪检测的方法, 将 THP-1 细胞接种于 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶(细胞密度为  $2 \times 10^9$ /L, 0.5% FCS RPMI 1640 培养液), 佛波酯 40 nmol/L 和 9-cisRA 100 nmol/L 共同加入, 24 h 后 PBS 洗并用 EDTA 将细胞消化下来, 2 000 r/min 4℃ 离心 5 min 得到细胞沉淀, 加入染色缓冲液重悬、计数, 保持每份样品细胞数为  $1 \times 10^6$  个, 2 000 r/min 4℃ 离心 5 min 弃上清, 加入 FITC 偶联的一抗(CD36、CD11b), 冰上、避光孵育 20~30 min, 2 000 r/min 4℃ 离心 5 min 后弃上清, 加染色缓冲液重悬(该步骤重复 2 次), 4℃ 保存用流式细胞仪检测。

### 1.5 统计学方法

数据用 SPSS 11.0 统计软件分析, 所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析, 均数间比较用 Dunnett *t* 检验。  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞形态学变化

THP-1 单核细胞悬浮生长, 呈圆形。佛波酯可以诱导 THP-1 向巨噬细胞分化, 使细胞贴壁生长, 并且形态呈梭形、分支状, 利用佛波酯 40 nmol/L 诱导 THP-1 细胞分化 48 h 时, 细胞贴壁力和分支、梭形细胞最显著, 用不同浓度佛波酯(10、21 和 40 nmol/L) 分别和 9-cisRA (1、10 和 100 nmol/L) 共同作用于 THP-1 细胞 48 h 后, 发现 9-cisRA 干预组细胞形态与佛波酯单独作用组相比, 分支、梭形和贴壁生长的细胞明显减少, 并且 9-cisRA 100 nmol/L 干预组更明显(图 1)。

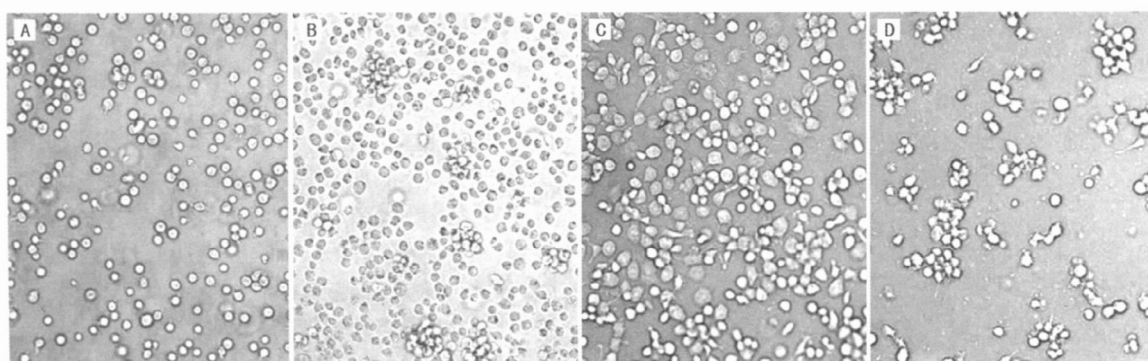


图 1. 9-顺式维甲酸抑制佛波酯诱导 THP-1 细胞分化(10×40)  
组, D 为 40 nmol/L 佛波酯+ 100 nmol/L 9-cisRA 组。

A 为空白对照组, B 为 100 nmol/L 9-cisRA 组, C 为 40 nmol/L 佛波酯

## 2.2 细胞贴壁率

佛波酯诱导 THP-1 细胞向巨噬细胞分化, 此时细胞产生贴壁的特性, 利用佛波酯浓度梯度作用于 THP-1 细胞 48 h 后, 用酶标仪检测吸光度, 发现在佛波酯 10~40 nmol/L 浓度范围, A 值达到最大(图 2), 表明在此浓度范围内巨噬细胞分化较成熟。利用不同浓度佛波酯(0、10、20 和 40 nmol/L)与不同浓度 9-cisRA(1、10 和 100 nmol/L)在 0.5% FCS RPMI1640 条件下共同作用 48 h 后, 检测 A 值, 结果表明在佛波酯 0 nmol/L 组 9-cisRA 对细胞贴壁率的影响没有显著变化; 在佛波酯 10 nmol/L 组不同浓度 9-cisRA(1、10、100 nmol/L)作用后细胞贴壁率分别减少为 30%、35% 和 44%; 在佛波酯 20 nmol/L 组细胞贴壁率分别减少为 31%、45% 和 52%; 在佛波酯 40 nmol/L 组细胞贴壁率分别减少为 21%、33% 和 44%, 说明 9-cisRA 可明显抑制佛波酯诱导 THP-1 细胞贴壁(图 3)。

## 2.3 流式细胞仪检测细胞表面标志物 CD36 和 CD11b 的表达

佛波酯诱导 THP-1 向巨噬细胞分化时, CD36 和 CD11b 的表达增高, 利用 40 nmol/L 佛波酯和 100 nmol/L 9-cisRA 共同作用 24 h 后, 流式细胞仪检测细胞表面标志物 CD36 和 CD11b 的表达, 发现 9-cisRA 可明显抑制佛波酯诱导的 CD36 和 CD11b 表达, 抑

率分别为 28% 和 50% ( $P < 0.01$ , 表 2 和图 4)。

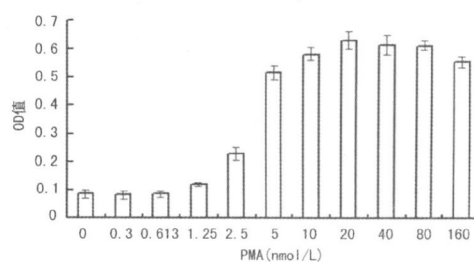


图 2. 不同剂量佛波酯诱导 THP-1 48 h 后细胞贴壁率的变化

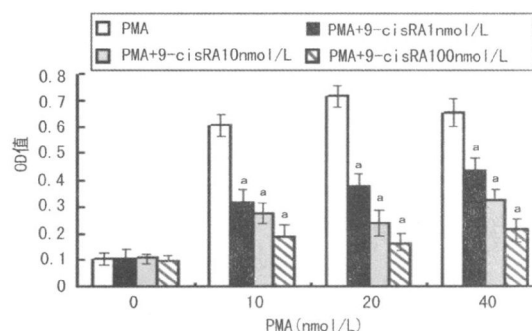


图 3. 不同浓度佛波酯与不同浓度 9-cisRA 共同作用 THP-1 后细胞贴壁率的变化 a 为  $P < 0.01$ , 与佛波酯单独作用组相比较。

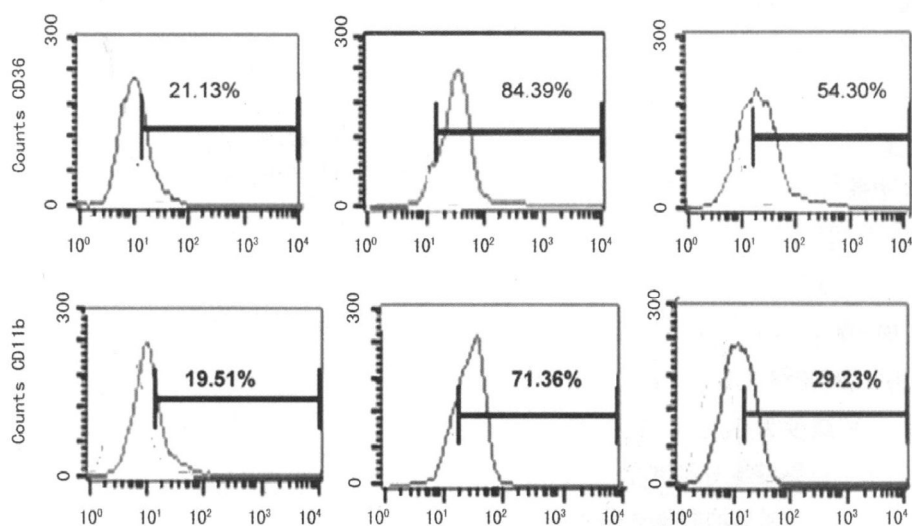


图 4. 流式细胞仪检测细胞表面标志物 CD36 和 CD11b 表达

表 2. 9-顺式维甲酸对细胞表面标志物表达的影响

分 组	CD36	CD11b
对照组	22.6% $\pm$ 1.9%	21.2% $\pm$ 2.4%
佛波酯组	82.5% $\pm$ 1.6% <sup>a</sup>	68.6% $\pm$ 2.4% <sup>a</sup>
佛波酯+ 9-cisRA 组	58.0% $\pm$ 6.3% <sup>b</sup>	34.0% $\pm$ 5.5% <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与佛波酯组比较。

左为对照组, 中为佛波酯组, 右为佛波酯+ 9-顺式维甲酸组。

## 3 讨论

动脉粥样硬化是多因素、多基因形成的慢性炎症性疾病, 炎症血管内膜局部分泌各种细胞因子和生长因子促进外周血单核细胞粘附、聚集、迁移进入血管内膜下, 进一步分化为巨噬细胞, 一方面通过上

调细胞表面清道夫受体,吞噬氧化型低密度脂蛋白、内源性毒素和热休克蛋白等;另一方面上调细胞表面 Toll 样受体,激活自身免疫系统;另外分泌各种炎症因子(如肿瘤坏死因子  $\alpha$  等)、化学因子和蛋白水解酶类物质等,对炎症血管局部产生损伤<sup>[7,8]</sup>,其中单核/巨噬细胞分化是动脉粥样硬化炎症反应发展过程中关键步骤,抑制该过程可以减轻动脉粥样硬化炎症反应,从而达到抗动脉粥样硬化的目的。

RXR 作为细胞核内公共异源二聚体搭档的独特性,广泛参与细胞凋亡、分化、胚胎发育、炎症、内环境稳定和代谢等生理过程,其调控异常与人类的许多疾病如心血管疾病、糖尿病、癌症和老年痴呆等密切相关<sup>[1,2]</sup>。众多研究表明 RXR 在心血管中扮演重要角色,主要表现在心肌发育、胰岛素抵抗和脂质代谢方面。有关 RXR 在动脉粥样硬化炎症反应中的作用尚不清楚, Schaire 等<sup>[9]</sup>发现 RXR 激动剂能抑制肾大鼠肾脏中炎症巨噬细胞浸润, Kolluri 等<sup>[10]</sup>发现 RXR 激活后,在肿瘤中发挥抗炎的作用。故本研究通过观察 RXR 特异性激动剂 9-cisRA 对佛波酯诱导的 THP-1 细胞分化的影响,以期进一步探讨 RXR 在动脉粥样硬化炎症方面的作用。

我们利用佛波酯诱导 THP-1 细胞向巨噬细胞分化模型,此模型与炎症中单核/巨噬细胞分化过程相似,且佛波酯也属体外较强的炎症刺激物,被广泛应用于动脉粥样硬化炎症研究<sup>[11]</sup>。在 THP-1 向巨噬细胞分化的过程中,细胞由圆形、悬浮生长转变为梭形、贴壁生长,且细胞分化表面标志物 CD36 和 CD11b 增高,这些变化可作为巨噬细胞分化的指标<sup>[12,13]</sup>。研究中通过相差显微镜观察细胞形态,佛波酯与 9-cisRA 共同作用组和佛波酯单独作用组相比较,梭形、分支状细胞较少。佛波酯 10 nmol/L 组加 9-cisRA (1、10、100 nmol/L) 共同作用后细胞贴壁率分别减少为 30%、35% 和 44%;在佛波酯 20 nmol/L 组细胞贴壁率分别减少为 31%、45% 和 52%;在佛波酯 40 nmol/L 组细胞贴壁率分别减少为 21%、33% 和 44%,可见 9-cisRA 可明显抑制佛波酯诱导 THP-1 细胞的贴壁率。40 nmol/L 佛波酯和 100 nmol/L 9-cisRA 共同作用于 THP-1 细胞 24 h 后,发现 9-cisRA 可明显抑制 CD36 和 CD11b 表达的阳性细胞数,抑制率分别为 28% 和 50% ( $P < 0.01$ )。本研究结果表明 9-cisRA 可明显抑制佛波酯诱导的人单核细胞 THP-1 向巨噬细胞分化。

有趣的是,有研究发现 9-cisRA 可促进 1, 25 (OH)<sub>2</sub>VD<sub>3</sub> 诱导单核细胞分化,这与本研究中发现 9-cisRA 在单核细胞向巨噬细胞分化中的作用相反,

而另有研究发现佛波酯和 1, 25 (OH)<sub>2</sub>VD<sub>3</sub> 以不同途径诱导单核细胞向巨噬细胞分化。这些结果提示 9-cisRA 可能抑制炎症状态下的单核/巨噬细胞分化,而不影响正常生理过程。

综上所述,本研究结果表明 RXR 特导性激动剂 9-cisRA 可显著抑制佛波酯诱导单核细胞 THP-1 向巨噬细胞分化,提示 RXR 可能是调控单核/巨噬细胞分化的重要途径。已有多项研究结果表明核受体 PPAR $\gamma$  在单核/巨噬细胞分化的炎症反应中扮演重要的调控作用<sup>[14,15]</sup>,并且 9-cisRA 可上调 THP-1 细胞 PPAR $\gamma$  基因,因此 9-cisRA 很可能通过促进 RXR 与 PPAR $\gamma$  形成异源二聚体参与调控单核/巨噬细胞分化,这有待进一步研究证实。

#### [参考文献]

- [1] Szanto A, Narkar V, Shen Q, et al. Retinoid X receptors: X-ploring their (patho) physiological functions [J]. *Cell Death Differ*, 2004, **11** (Suppl 2): S126-S143.
- [2] Chen T, Xie W, Agler M, et al. Coactivators in assay design for nuclear hormone receptor drug discovery [J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2003, **12** (6): 835-842.
- [3] Lu TT, Repa JJ, Mangelsdorf DJ. Orphan nuclear receptors as LXRs and FXRs of sterol metabolism [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276** (41): 37 735-738.
- [4] 沈玲红, 王彬尧, 何奔, 等. 9-顺式维甲酸抑制脂多糖诱导小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 向树突样细胞分化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (5): 329-332.
- [5] Shen Q, Cline GW, Shulman GI, et al. Effects of rexinoids on glucose transport and insulin-mediated signaling in skeletal muscles of diabetic (db/db) mice [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (19): 19 721-731.
- [6] Singh AH, Liu S, Crombie DL, et al. Differential effects of rexinoids and thiazolidinediones on metabolic gene expression in diabetic rodents [J]. *Mol Pharmacol*, 2001, **59** (4): 765-773.
- [7] Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition [J]. *Annu Rev Immunol*, 2002, **20**: 197-216.
- [8] Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity [J]. *Curr Opin Immunol*, 2002, **14** (1): 123-128.
- [9] Schairer M, Liebler S, Schade K, et al. Retinoic acid receptor  $\alpha$  and retinoid X receptor specific agonists reduce renal injury in established chronic glomerulonephritis of the rat [J]. *J Mol Med*, 2004, **82** (2): 116-125.
- [10] Kolluri SK, Corr M, James SY, et al. The R-enantiomer of the nonsteroidal antiinflammatory drug etodolac binds retinoid X receptor and induces tumor-selective apoptosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** (7): 2 525-530.
- [11] Vosper H, Khoudoli GA, Palmer CN. The peroxisome proliferator activated receptor delta is required for the differentiation of THP-1 monocytic cells by phorbol ester [J]. *Nucl Recept*, 2003, **1** (1): 9.
- [12] Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques: a potential role in acute plaque disruption [J]. *Stroke*, 2000, **31** (1): 40-47.
- [13] Pollanen PJ, Karhunen PJ, Mikkelsen J, et al. Coronary artery complicated lesion area is related to functional polymorphism of matrix metalloproteinase 9 gene: an autopsy study [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (9): 1 446-450.
- [14] 张俊峰, 葛恒, 王长谦, 等. PPARs 配体对巨噬细胞、泡沫细胞细胞外基质金属蛋白酶诱导因子表达的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006, **22** (8): 1 519-523.
- [15] Ricote M, Li AC, Willson TM, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a negative regulator of macrophage activation [J]. *Nature*, 1998, **391** (6662): 79-82.

(此文编辑 许雪梅)