

[文章编号] 1007-3949(2009)17-10-0807-04

• 实验研究 •

白藜芦醇对单核细胞表达 CC 类趋化因子受体 2 基因和 内皮细胞分泌单核细胞趋化蛋白 1 的影响

朱鹏立, 沈阳辉, 贾德安, 阮景明, 余惠珍

(福建省立医院 福建省临床老年病研究所 福建医科大学省立临床医学院, 福建省福州市 350001)

[关键词] 白藜芦醇; 动脉粥样硬化; 趋化因子受体; 单核细胞趋化蛋白 1; 趋化作用

[摘要] 目的 探讨白藜芦醇对活化的人脐静脉内皮细胞分泌单核细胞趋化蛋白 1 及对人单核细胞株 THP-1 细胞表面 CC 类趋化因子受体 2 基因表达的影响。方法 半定量逆转录聚合酶链反应法检测 THP-1 细胞 CC 类趋化因子受体 2 mRNA 的表达; 以肿瘤坏死因子 α 激活人脐静脉内皮细胞, 酶联免疫吸附法测定活化的人脐静脉内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1 的分泌。结果 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇可以抑制 THP-1 细胞 CC 类趋化因子受体 2 mRNA 的表达 (0.19 ± 0.02 和 0.06 ± 0.02 比 0.73 ± 0.15 , $P < 0.01$), 且随着白藜芦醇剂量的升高 (1, 10, 50 $\mu\text{mol/L}$), 基因表达抑制也逐渐加强 ($P < 0.01$); 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇可减少活化的人脐静脉内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1 的分泌 ($9.663 \pm 3.33 \pm 9.27 \pm 3.8$ ng/L 和 $2.822 \pm 1.7 \pm 4.72 \pm 4.7$ ng/L 比 $16.595 \pm 6.7 \pm 1.667 \pm 3.9$ ng/L, $P < 0.01$), 随着白藜芦醇剂量升高, 单核细胞趋化蛋白 1 分泌逐渐减少 ($P < 0.01$)。结论 白藜芦醇能剂量依赖性抑制单核细胞 CC 类趋化因子受体 2 基因的表达, 并减少活化的内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1 的分泌, 从而有效抑制单核细胞的趋化, 发挥抗动脉粥样硬化的作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Resveratrol on Expression of CC Chemokine Receptor 2 Gene in Monocytes and Secretion of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Endothelial Cells

ZHU Peng-Li, SHEN Yang-Hui, JIA De-An, RUAN Jing-Ming and YU Hui-Zhen

(Fujian Provincial Hospital, Fujian Institute of Clinical Geriatrics, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

[KEY WORDS] Resveratrol; Atherosclerosis; Chemokine Receptor; Monocyte Chemoattractant Protein-1; Chemotaxis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of resveratrol on the secretion of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in activated human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), and the expression of CC chemokine receptor 2 (CCR2) gene in human monocyte cell line THP-1 cells. **Methods** The expression level of CCR2 gene was measured by semi quantitative reverse expression polymerase-chain reaction in THP-1 cells. HUVEC were activated with tumor necrosis factor- α after preincubation of resveratrol. Then the secretion of MCP-1 in the cultivate supernatant of HUVEC was investigated by enzyme linked immunosorbent assay. **Results** The expression of CCR2 gene was inhibited by 10 $\mu\text{mol/L}$ and 50 $\mu\text{mol/L}$ resveratrol in monocyte (0.19 ± 0.02 and 0.06 ± 0.02 vs 0.73 ± 0.15 , $P < 0.01$). The inhibition was increased with the dosage of resveratrol (1 $\mu\text{mol/L}$, 10 $\mu\text{mol/L}$ and 50 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$). The secretion of MCP-1 protein in activated HUVEC was suppressed by 10 $\mu\text{mol/L}$ and 50 $\mu\text{mol/L}$ resveratrol ($9.663 \pm 3.33 \pm 9.27 \pm 3.8$ ng/L and $2.822 \pm 1.7 \pm 4.72 \pm 4.7$ ng/L vs $16.595 \pm 6.7 \pm 1.667 \pm 3.9$ ng/L, $P < 0.01$). The suppression was enhanced with the increased dosage of resveratrol ($P < 0.01$). **Conclusion** Resveratrol can inhibit the expression of CCR2 gene in THP-1 cell and suppress the secretion of MCP-1 in activated HUVEC. Both effects are in a dose-dependent manner, which may actively suppress chemotaxis of mononuclear cells. It may contribute to resveratrol's anti-atherosclerosis effects.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 被认为是一种慢性炎性增殖反应^[1]。在这一过程中, 单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 及其高亲和力受体 CC 类趋化因子受体 2 (CC

chemokine receptor 2, CCR2) 决定着 As 早期单核细胞的迁移、病灶的大小及复杂性^[2]。白藜芦醇 (resveratrol, Res) 是一种非黄酮类多酚化合物, 化学名为 3, 5, 4'-三羟基-反-二苯代乙烯, 是植物在恶劣环境或受到霉菌感染时产生的一种植物抗毒素, 可通过抗血栓、保护血管内皮、抑制血管平滑肌细胞增殖、稳定斑块等发挥心血管保护作用^[3-5], 但目前白藜芦醇抗 As 的具体作用机制还未完全明确。本研究旨在通过观察白藜芦醇对体外培养的人单核细胞株 THP-1 细胞 CCR2 基因表达的影响, 以及对人脐

[收稿日期] 2009-08-02 [修回日期] 2009-10-06

[基金项目] 卫生部科学研究基金 福建省卫生教育联合攻关计划资助项目 (WKJ2005-2-017), 福建省自然科学基金资助项目 (Z0516069)

[作者简介] 朱鹏立, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, Email: zp17755@126.com。沈阳辉, 研究方向为动脉粥样硬化干预治疗。贾德安, 研究方向为动脉粥样硬化干预治疗。

静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells HUVEC)分泌 MCP-1的作用,进一步探讨白藜芦醇抗 As 的相关作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

人单核细胞株 THP-1 细胞购自中国科学院细胞库; RPM I1640 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司; HUVEC 和含有低血清生长添加物的 M 200 培养基均购自美国 Cascade Bio 公司; 反式白藜芦醇、二甲基亚砷购自美国 Sigma 公司; TRIzol RNA 提取试剂购自美国 Invitrogen 公司; 两步法 RT-PCR 试剂盒购自美国 Promega 公司; MCP-1 酶联免疫吸附试验检测试剂盒购自德国 Bender 公司; 引物由 Invitrogen 公司合成。其他试剂均为国产分析纯或进口分装。

1.2 细胞培养

将 THP-1 悬浮培养于 RPM I1640 培养基中 (含 2 mmol/L 谷氨酰胺、15 mmol/L 羟乙基哌嗪乙硫磺酸、1.0 mmol/L 丙酮酸钠、 1×10^5 U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素、 5×10^{-5} mmol/L β 巯基乙醇及 10% 胎牛血清), 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 每 2~3 天传代 1 次, 使细胞密度保持在 $10^8 \sim 10^9$ /L。HUVEC 接种于 M 200 培养基中, 在 37℃、5% CO₂ 环境中培养, 隔天换液。正式试验前台盼兰拒染法测单核细胞和内皮细胞活力均在 98.5% 以上。

1.3 干预处理及分组

取生长良好的 THP-1 细胞, 试验前换新鲜培养基并调整细胞浓度为 5×10^8 /L, 转至 6 孔板上分四组: 空白组、1 μ mol/L 白藜芦醇组、10 μ mol/L 白藜芦醇组和 50 μ mol/L 白藜芦醇组, 药物处理 24 h 后收集细胞用于总 RNA 的提取。

取 3~4 代生长良好的 HUVEC, 试验前换新鲜培养基并调整细胞浓度为 5×10^7 /L, 转至 6 孔板上待细胞生长汇合至 80% 时, 给予白藜芦醇及肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 处理并分五组: 空白组、TNF- α 组、1 μ mol/L 白藜芦醇组、10 μ mol/L 白藜芦醇组和 50 μ mol/L 白藜芦醇组。白藜芦醇处理组实验顺序为不同浓度白藜芦醇预孵育 2 h 后加入 TNF- α (10 μ g/L) 刺激 24 h 空白组加入相应浓度的二甲基亚砷液。收集细胞培养上清液用于酶联免疫吸附试验检测。

1.4 半定量逆转录聚合酶链反应

利用 TRIzol 法提取 THP-1 细胞总 RNA, 核酸分

析仪测 RNA 浓度, OD_{260/280} 均为 1.8~2.0 提示 RNA 纯度较高。取 2 μ g 总 RNA 为模板, 进行逆转录合成 cDNA, 反应条件按照试剂盒说明进行。取 cDNA 产物 1 μ L 为模板进行 PCR 扩增目的片段。CCR2 基因引物序列为上游 5'-ATG CTG TCC ACA TCT CGT TCT CG-3', 下游 5'-TTA TAA ACC AGC CGA GAC TTC CTG C-3'; 内参 GAPDH 基因引物序列为上游 5'-CCC ATT TCG ACG ATG ACG-3', 下游 5'-CGG CAC TGA GGA ATG ATC TAA G-3'。反应条件为 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 64℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 60 s, CCR2 基因 30 个循环, 内参基因 26 个循环, 末次延伸为 72℃ 10 min, 反应体系为 25 μ L。反应完毕, 取产物 10 μ L 于 1.5% 的琼脂糖凝胶中 100 V 电泳 20 min, 凝胶成像系统下进行扫描, 图像分析系统检测各组目的基因及其内参基因的灰度值, 计算两者的比值作为 CCR2 基因的相对表达量。

1.5 酶联免疫吸附试验检测单核细胞趋化蛋白 1 的含量

收集各组 HUVEC 培养上清液, 用样品稀释液 30 倍稀释后, 按照试剂盒上说明进行试验步骤, 最后用自动酶标仪 450 nm 波长测定各样本的吸光度, 绘制标准曲线, 由标准曲线计算出各样本 MCP-1 的含量。

1.6 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差齐性检验用 Levene 法, 采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白藜芦醇对 THP-1 细胞 CC 类趋化因子受体 2 mRNA 表达的影响

THP-1 细胞经 1 μ mol/L、10 μ mol/L 和 50 μ mol/L 白藜芦醇预孵育 2 h 后细胞 CCR2 mRNA 表达均较空白组降低, 分别为空白组的 0.83 倍、0.26 倍和 0.09 倍。但 1 μ mol/L 白藜芦醇组表达量与空白组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 10 μ mol/L 和 50 μ mol/L 白藜芦醇组 THP-1 细胞 CCR2 mRNA 的表达均较空白组明显降低 ($P < 0.01$); 在白藜芦醇低、中、高三个剂量组之间, 随着剂量升高, CCR2 mRNA 的表达也逐渐下降 ($P < 0.01$; 图 1 和表 1)。

2.2 白藜芦醇对活化的人脐静脉内皮细胞分泌单核细胞趋化蛋白 1 的影响

正常状态下 HUVEC 几乎不分泌 MCP-1, 而当

受到 TNF- α 刺激后 MCP-1 分泌明显增多, 为正常的 35 倍 ($P < 0.01$)。而先经白藜芦醇孵育 2 h 后的 HUVEC, 再受到 TNF- α 刺激 24 h MCP-1 分泌受到抑制, 以 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组和 50 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组更明显, MCP-1 分别为 TNF- α 组的 58% 和 17%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 在白藜芦醇三个剂量组之间, 随着剂量升高, MCP-1 的分泌也逐渐减少 ($P < 0.01$; 表 2)。

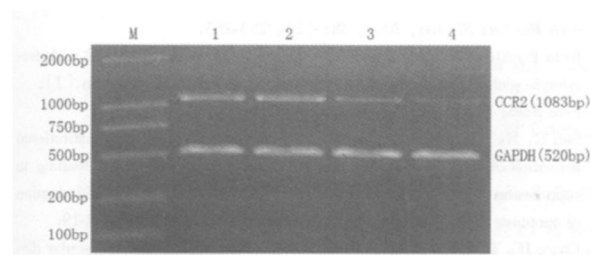


图 1 白藜芦醇预孵育后 THP-1 细胞 CCR2 类趋化因子受体 2 基因 PCR 产物电泳图 M 为 Marker, 1 为空白组, 2~4 分别为 1 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组。

表 1 白藜芦醇对 THP-1 细胞 CCR2 类趋化因子受体 2 基因表达量的影响 ($n = 5$)

分 组	CCR2 mRNA
空白组	0.73 \pm 0.15
1 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组	0.61 \pm 0.16
10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组	0.19 \pm 0.02 ^{ab}
50 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组	0.06 \pm 0.02 ^{abc}

a 为 $P < 0.01$, 与空白组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 1 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组比较。

表 2 白藜芦醇对肿瘤坏死因子 α 活化的人脐静脉内皮细胞分泌单核细胞趋化蛋白 1 的影响 ($n = 5$)

分 组	MCP-1 浓度 (ng/L)
空白组	465.40 \pm 61.08
TNF- α 组	16595.67 \pm 1667.39 ^a
1 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组	14640.67 \pm 235.77 ^a
10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组	9663.33 \pm 927.38 ^{abc}
50 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组	2822.17 \pm 472.47 ^{abcd}

a 为 $P < 0.01$, 与空白组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 TNF- α 组比较; c 为 $P < 0.01$, 与 1 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组比较; d 为 $P < 0.01$, 与 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组比较。

3 讨论

As 是一种由多因素作用下、以血管壁炎症和纤维细胞增殖为特征的慢性炎症过程, 最早期的显著标志是循环中的单核细胞黏附于内皮细胞, 侵入损

伤的血管壁, 并分化为巨噬细胞释放大量的炎症介质引起炎症反应^[6]。而趋化因子通过与靶细胞表面相应的受体结合, 招募外周血单核细胞、淋巴细胞进入内皮下间隙使炎症反应进一步放大。

CCR2 作为一种高亲和力膜糖蛋白受体, 与循环中的 MCP-1 结合, 活化单核细胞, 激活细胞内第二信使系统, 如活化蛋白激酶 C, 引起细胞内 Ca^{2+} 水平的升高, 促进单核细胞向炎症部位迁移^[7]; 也可通过酪氨酸激酶 (tyrosine kinase, JAK) / 信号转导子和转录活化子 (signal transducer and activators of transcription, STAT) 途径, 激活核转录因子使下游炎症因子基因表达^[8]。动物研究发现^[9], CCR2 基因敲除小鼠在缺乏载脂蛋白 E 情况下单核 / 巨噬细胞的聚集减少。

MCP-1 是一种特异性单核细胞趋化因子, 可以趋化和激活单核细胞, 正常动脉中表达量少, 但 As 早期斑块中即有 MCP-1 异常高表达^[10]。在 LDL 受体敲除的小鼠, 高脂饮食迅速诱导主动脉 MCP-1 表达, 伴有单核 / 巨噬细胞大量聚集^[11]。LDL 受体 / MCP-1 基因缺陷小鼠表现为单核 / 巨噬细胞的募集减少, 表明 MCP 基因敲除对 LDL 受体缺陷转基因鼠也具有抗 As 的保护作用^[12], 而 CCR2 敲除或抗 MCP-1 基因治疗可明显延缓动脉粥样斑块的形成^[13]。

国内袁征等^[14]研究表明, 高同型半胱氨酸血症可能通过增强冠状动脉内皮细胞 MCP-1 表达, 促进实验大鼠冠心病的发生和发展。汪雁归等^[15]发现, 急性冠状动脉综合征患者血清 MCP-1 浓度和 CCR2 蛋白表达水平均显著高于健康人, 提示其与急性冠状动脉综合征的发生发展有关。因此, 减少单核细胞表面 CCR2 受体的表达或减少内皮细胞 MCP-1 分泌均可延缓早期单核细胞黏附及粥样斑块形成。

本研究结果显示单核细胞本身已有较高水平的 CCR2 基因表达, 可能与其维持正常的细胞功能有关; 而单核细胞与白藜芦醇共同孵育 2 h 后, CCR2 基因表达均减少并呈白藜芦醇剂量依赖性, 但低剂量 (1 $\mu\text{mol/L}$) 组的减少不具有统计学意义, 推测可能与白藜芦醇作用浓度及作用时间有关, 而 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇可显著减少 CCR2 基因的表达水平。白藜芦醇具体是通过何种信号途径抑制 CCR2 基因的表达, 还需要进一步的研究。

实验中通过体外培养 HUVEC, 利用 TNF- α 作为刺激因素, 模拟 As 中炎症因子对血管内皮细胞的损伤, 结果发现正常的 HUVEC 几乎不分泌 MCP-1, 而受到 TNF- α 作用后, 内皮细胞被激活, 分泌大量

的 MCP-1 到细胞外, 与动物实验和人体试验研究的结果一致^[16]。当用白藜芦醇预处理细胞后, TNF- α 刺激内皮细胞分泌 MCP-1 的作用明显被抑制, 这说明白藜芦醇可以抑制被炎症因子 TNF- α 活化的内皮细胞分泌 MCP-1。

综上所述, 本研究结果提示白藜芦醇不仅可以抑制内皮细胞 MCP-1 的分泌, 还可直接作用于单核细胞使 CCR2 的表达减少。由此推测白藜芦醇可能通过抑制循环中单核细胞经由 MCP-1/CCR2 途径向内皮细胞的趋化, 减少单核细胞向血管壁的迁移, 阻止 As 早期病变的形成, 从而发挥其抗 As 的作用。

[参考文献]

- [1] Libby P. Inflammation in atherosclerosis [J]. *Nature* 2002 **420** (6917): 868-874
- [2] Reape TJ, Groot PH. Chemokines and atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis* 1999 **147** (2): 213-225
- [3] Jang M, Cai L, Udeani GO, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol: a natural product derived from grapes [J]. *Science* 1997 **275** (5297): 218-220
- [4] Wallerath T, Deckert G, Temes T, et al. Resveratrol: a polyphenolic phytoalexin present in red wine enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase [J]. *Circulation* 2002 **106** (13): 1652-658
- [5] Arain O, Ballantyne J, Waterhouse AL, et al. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation with red wine and red wine polyphenols [J]. *J Vas Surg* 2002 **35** (6): 1226-232
- [6] Sun C, Hu Y, Liu X, et al. Resveratrol downregulates the constitutive activation of nuclear factor-kappaB in multiple myeloma cells leading to suppression of proliferation and invasion, arrest of cell cycle and induction of apoptosis [J]. *Cancer Genet Cytogenet* 2006 **165** (1): 9-19
- [7] Shah PK. Plaque disruption and thrombosis: potential role of inflammation and infection [J]. *Cardiol Clin* 1999 **17** (2): 270-281
- [8] Mukamal KJ, Conigrave KM, Mittleman MA, et al. Roles of drinking pattern and type of alcohol consumed in coronary heart disease in men [J]. *N Engl J Med* 2003 **348** (2): 109-118
- [9] Sato M, Maulik N, Das DK. Cardioprotection with alcohol: role of both alcohol and polyphenolic antioxidants [J]. *Ann N Y Acad Sci* 2002 **957**: 122-135
- [10] Burkitt MJ, Duncan J. Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxyl radical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl radical scavenging and a novel glutathione-sparing mechanism of action [J]. *Arch Biochem Biophys* 2000 **381** (2): 253-263
- [11] Briot P, Almeida IM, Dinis TC. The interaction of resveratrol with ferrihnyor-globin and peroxynitrite: protection against LDL oxidation [J]. *Free Radic Res* 2002 **36** (6): 621-631
- [12] Sun C, Hu Y, Liu X, et al. Resveratrol downregulates the constitutive activation of nuclear factor-kappaB in multiple myeloma cells leading to suppression of proliferation and invasion, arrest of cell cycle and induction of apoptosis [J]. *Cancer Genet Cytogenet* 2006 **165** (1): 9-19
- [13] Charo IF, Taubman MB. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease [J]. *Circ Res* 2004 **95** (9): 858-866
- [14] 袁征, 王晓燕, 曾玉梅, 等. 高同型半胱氨酸血症大鼠冠状动脉内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1 的表达 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008 **16** (3): 177-180
- [15] 汪雁归, 刘昭前, 杨天嵩, 等. 急性冠状动脉综合征患者血清 MCP-1 浓度和 CCR2 蛋白表达水平的变化 [J]. *中南大学学报 (医学版)*, 2009 **34** (4): 318-322
- [16] Inoue S, Egashira K, Ni W, et al. Antimonocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice [J]. *Circulation* 2002 **106** (21): 2700-706

(此文编辑 许雪梅)