

血小板因子 4 促进人脐静脉内皮细胞 Toll 样受体 2 的表达

彭茜¹, 唐雅玲², 许增祥², 何钒², 杨永宗²

(1. 顺德勒流医院, 广东省佛山市 528322 2. 南华大学心血管病研究所 动脉硬化学湖南省重点实验室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 血小板因子 4 Toll 样受体 2 内皮细胞

[摘要] 目的 探讨血小板因子 4 对人脐静脉内皮细胞 Toll 样受体 2 表达的影响。方法 采用人重组细胞因子血小板因子 4 刺激人脐静脉内皮细胞株 ECV304 通过 RT-PCR 和 Western Blotting 分别检测 ECV304 中 Toll 样受体 2 mRNA 和蛋白表达。细胞免疫组织化学法检测血小板因子 4 刺激后 ECV304 中 Toll 样受体 2 的表达量。结果 血小板因子 4 刺激人脐静脉内皮细胞株后能促进 Toll 样受体 2 mRNA 和蛋白表达。与空白组相比, 100 μ g/L 血小板因子 4 处理人脐静脉内皮细胞株能在基因及蛋白水平促进其 Toll 样受体 2 表达并呈现一定的时间依赖性 ($n = 5$ $P < 0.05$), 且肝素不能抑制血小板因子 4 的这种作用。细胞免疫组织化学法也显示与空白组 (0.001385 ± 0.000953) 相比, 血小板因子 4 处理后人脐静脉内皮细胞 Toll 样受体 2 表达显著增多 (0.060399 ± 0.020998 $P < 0.05$)。结论 血小板因子 4 促进人脐静脉内皮细胞株表达 Toll 样受体 2 此效应可能与血小板在动脉粥样硬化中的作用有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Platelet Factor 4 Promotes Toll Like Receptors Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

PENG Qian¹, TANG Ya-Ling², XU Zeng-Xiang², HE Fan², and YANG Yong-Zong²

(1. Shunde Leliu Hospital, Foshan, Guangdong 528322 2. Institute of Cardiovascular Disease, Key Lab for Arteriosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Platelet Factor 4 Toll Like Receptors 2 Endothelial Cells

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of platelet factor 4 (PF4) on the expression of Toll like receptors 2 (TLR2) in human umbilical vein endothelial cells-ECV304. **Methods** The effects of PF4 on the expression of TLR2 in ECV304 were determined by reverse-transcription polymerase chain reaction, Western Blotting and immunohistochemistry analysis. **Results** In comparison with blank group, the levels of TLR2 mRNA and protein upregulated ($n = 5$ $P < 0.05$) in time dependent manner in PF4 (100 μ g/L) group, but it could not be inhibited by heparin. Using immunohistochemical staining and image analysis methods, the TLR2 expression in ECV304 in PF4 group was increased compared with blank group (0.060399 ± 0.020998 vs 0.001385 ± 0.000953 $P < 0.05$). **Conclusion** PF4 promotes the expression of TLR2 mRNA and protein in human umbilical vein endothelial cells. The result of study is useful for platelet to play effect on innate immunity in chronic inflammatory such as atherosclerosis.

血小板因子 4 (platelet factor 4, PF4) 是活化的血小板释放的活性物质之一, 它具有多种促动脉粥样硬化作用。PF4 不仅促进单核细胞向内皮细胞的黏附, 还可抑制低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 降解^[1], 并直接与氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 结合而促进内皮细胞、平滑肌细胞以及巨噬细胞结合 ox-LDL^[2]。本实验室研究结果显示 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉斑块肩部和内皮细胞可见 PF4 表达增高^[3]。Toll

样受体 (Toll like receptors, TLR) 之一 TLR2 在动脉粥样硬化形成过程的作用日益引起关注。TLR2 缺乏的动物动脉粥样硬化斑块病变明显减少^[4, 5]。TLR2 不仅可促进动脉粥样硬化炎症反应的信号传导, 还有证据显示 TLR2 参与了脂质摄取过程, Cao 等^[6]发现肺炎衣原体通过 TLR2 介导泡沫细胞形成。TLR2 是 TLR 家族中识别配体种类最多的受体, 它不仅可识别外源性配体, 而且也识别热休克蛋白等内源性配体。本实验室研究结果显示 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉斑块可见 TLR2 表达上调, 并且 TLR2 主要表达在斑块的內皮细胞和巨噬细胞上。这说明 PF4 可能通过调控内皮细胞 TLR2 的表达参与天然免疫过程。

[收稿日期] 2009-11-05 [修回日期] 2010-05-10

[作者简介] 彭茜, 硕士, 医师, 主要从事动脉粥样硬化防治研究, Email 为 capaser@sohu.com。唐雅玲, 硕士, 实验师, 主要从事动脉粥样硬化防治研究。杨永宗, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化防治。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

重组人 PF4 细胞因子购自 Peprotech 公司; 肝素、脂多糖、SYNR Green I 购自上海捷瑞公司; 人脐静脉内皮细胞株 ECV304 购自北京肿瘤所; 羊抗 TLR2 多克隆一抗、化学发光剂购自 Santa Cruz 公司; 兔抗羊辣根过氧化物酶二抗 (Invitrogen) 购自武汉博士德公司; 即用型免疫组织化学超敏 UltraSensitive™ SP(羊)试剂盒、DAB 显色试剂盒购自福州迈新公司; 总 RNA 提取试剂购自 TaKaRa 公司; cDNA 第一链合成试剂盒购自 Fementas 公司; Taq PCR Master Mix 以及 DNA Marker 购自北京天根公司; 所有引物都是上海生工生物工程服务有限公司合成。PCR 仪为美国 BioRad 公司产品; 凝胶成像分析系统 (GOS7500 型) 为美国 UVP 公司产品; 紫外分光光度计 (Lambda25 型) 为美国 PE 公司产品; 数码 CCD 成像系统 (DS-5M 型) 为日本 Nikon 公司产品。

1.2 细胞培养

调整细胞数为 2×10^5 /L, 接种于玻璃培养瓶中, 用含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 每 24 h 至 48 h 用 0.25% 胰酶消化后传代。

1.3 实验分组

最佳浓度梯度实验: 分空白组和 PF4 25、50、100 和 200 μg/L 组及 LPS 组 (100 μg/L), 处理时间根据基因检测和蛋白检测的不同分别为 4 h 和 12 h。④最佳时间梯度实验: PF4 浓度根据浓度梯度实验决定, 基因检测处理时间分别为 0 h、1 h、2 h、4 h 和 8 h, 蛋白检测处理时间分别为 0 h、3 h、6 h、12 h 和 24 h。④PF4 拮抗剂肝素对内皮细胞表达 TLR2 的影响: 根据前两个实验决定 PF4 最佳浓度以及时间, 分为空白组、PF4 组、PF4+ 肝素组、肝素组和 LPS 组。细胞免疫组织化学实验: 分空白组、PF4 组和 LPS 组。

1.4 内皮细胞 Toll 样受体 2 mRNA 测定

提取总 RNA 后, 根据 RT-PCR 试剂盒提供方法进行 RT-PCR。引物序列为 TLR2 上游 5'-ttgaagt-tctccagctctctg-3', 下游 5'-gccagctcttgattgattgg-3', 产物 346 bp; GAPDH 上游 5'-tgatgacatcaagaagggtgaag-3', 下游 5'-tccttgaggccatgtggccat-3', 产物 240 bp。TLR2 PCR 反应以 94℃预变性 5 min, 95℃变性 30 s, 54℃退火 45 s, 72℃延伸 50 s, 共 32 个循环, 最后一次循环在 72℃延伸 10 min。内参 PCR 反应则首次循环 94℃预变性 5 min, 再以 94℃变性 30 s, 60℃

退火 45 s, 72℃延伸 30 s, 共 30 个循环, 最后再 72℃延伸 10 min。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 用凝胶成像分析系统对电泳条带拍照以及分析, 以各组目的基因与内参基因的吸光度值的比值比较各组目的基因 mRNA 表达差异。每组实验重复 3 次。

1.5 内皮细胞 Toll 样受体 2 蛋白含量测定

提取细胞总蛋白/核蛋白后, 将变性过的蛋白行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分离胶浓度为 12%, 电泳后半干转移到硝酸纤维素膜上, 丽春红染色看转膜情况, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 一抗以最佳浓度稀释 (TLR2 为 1: 800, β-actin 为 1: 2 000) 后 4℃孵育 12 h, TBST 洗膜 10 min × 3 次, 洗膜后用相应辣根过氧化物酶二抗 (1: 1000) 于 4℃孵育 2 h, TBST 洗膜 3 × 5 min, 按 Western 印迹化学发光试剂盒说明显示于 X 光片上, 蛋白条带用 Labworks 图像分析系统扫描, 测定目的蛋白和内参蛋白的灰度值, 并计算二者比值, 以此作为各组蛋白相对表达量。

1.6 细胞免疫组织化学法测定内皮细胞 Toll 样受体 2 表达

按每孔 10^5 个细胞将内皮细胞接种于 6 孔板中, 贴壁达到 80% 汇合时进行以下处理: PBS 液洗涤细胞 3 次, 分别加入无血清 DMEM 液、PF4 + DMEM 和 LPS (100 μg/L) + DMEM, 置培养箱培养进行处理 (PF4 浓度及处理时间依据本实验相关结果)。处理结束, 采用多聚甲醛固定细胞, 3% H₂O₂ 去除内源性过氧化物酶, 10% 羊正常血清封闭 30 min, 吸去血清, 加入羊抗 TLR2 一抗 (1: 300), 4℃孵育过夜, PBS 洗 5 min × 3 次, 加入生物素化兔抗羊二抗, 室温 20 min, PBS 洗 5 min × 3 次。最后加入生物素化辣根过氧化物酶标记物反应 10 min, DAB 显色, 镜下控制显色时间。苏木素复染 10 min, 1% 盐酸酒精分化, 流水冲洗返蓝, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。数码 CCD 成像系统拍照保存, NIH ImageJ 图像分析软件分析灰度值。

1.7 统计学分析

SPSS11.5 统计分析软件进行统计学处理。实验所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析和 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 判定差异的显著性。

2 结果

2.1 不同浓度血小板因子 4 在基因和蛋白水平对内皮细胞 Toll 样受体 2 表达的影响

不同浓度 PF4 处理内皮细胞 6 h 后, 25 μg/L PF4 作用时 TLR2 mRNA 水平就有增加, 而到 100

μg/L时 TLR2 mRNA 水平与空白组差异有统计学意义(表 1和图 1)。不同浓度 PF4处理内皮细胞 24 h后,发现较低浓度 (25 μg/L)即有 TLR2蛋白表达上调,但是也是到 100 μg/L之后 TLR2表达才与空白组的差异有统计学意义(表 1和图 1)。

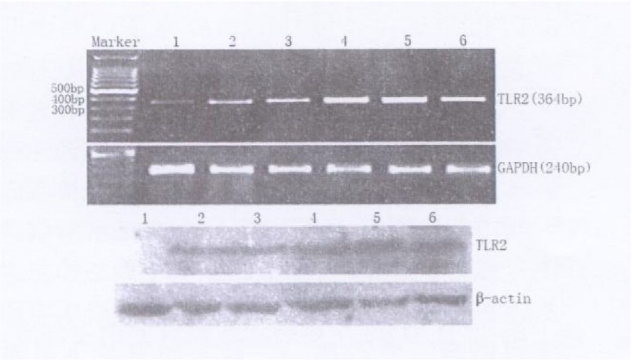


图 1 不同浓度血小板因子 4处理内皮细胞后其 Toll样受体 2 mRNA(上图)及蛋白(下图)表达情况 1为空白组, 2为 25 μg/L PF4处理组, 3为 50 μg/L PF4处理组, 4为 100 μg/L PF4处理组, 5为 200 μg/L PF4处理组, 6为 LPS组。

表 1 不同浓度血小板因子 4处理内皮细胞后其 Toll样受体 2 mRNA 及蛋白表达 (n= 5)

| 分 组 | mRNA | 蛋白 |
|---------------|----------------------------|----------------------------|
| 空白组 | 0.417 ± 0.085 | 0.139 ± 0.015 |
| 25 μg/L PF4组 | 0.778 ± 0.068 ^b | 0.339 ± 0.052 ^b |
| 50 μg/L PF4组 | 0.836 ± 0.051 ^b | 0.342 ± 0.084 ^b |
| 100 μg/L PF4组 | 1.420 ± 0.074 ^a | 0.483 ± 0.058 ^a |
| 200 μg/L PF4组 | 1.380 ± 0.045 ^a | 0.482 ± 0.078 ^a |
| LPS 组 | 1.290 ± 0.081 | 0.436 ± 0.061 |

a为 $P < 0.05$ 与空白组相比; b为 $P < 0.05$ 与 LPS组相比。

2.2 血小板因子 4处理内皮细胞不同时间其 Toll样受体 2 mRNA 以及蛋白表达的变化

利用前面实验所获得的最佳实验浓度 (100 μg/L)来处理内皮细胞不同时间,发现 PF4诱导 TLR2 mRNA 及蛋白表达呈现一定的时间依赖性。经 PF4处理 2 h其内皮细胞 TLR2 mRNA 表达即有增加,在 4 h增加明显,8 h开始回落;而 TLR2蛋白表达高峰在 12 h,24 h时表达量降低(表 2、表 3和图 2)。

2.3 细胞免疫组织化学检测血小板因子 4促进 Toll样受体 2在内皮细胞上表达

与空白组 (0.001385 ± 0.000953)相比,PF4可促进人脐静脉内皮细胞株表达 TLR2 (0.060399 ± 0.020998, $n = 6$, $P < 0.05$),但其作用与 LPS组 (0.038068 ± 0.011038)相比差异无显著性 ($P > 0.05$ 图 3)。

表 2 血小板因子 4处理不同时间内皮细胞 Toll样受体 2 mRNA 表达 (n= 5)

| 分 组 | mRNA |
|-----------|-----------------------------|
| 空白组 | 0.844 ± 0.060 |
| PF4处理 1 h | 0.989 ± 0.042 |
| PF4处理 2 h | 1.580 ± 0.051 ^a |
| PF4处理 4 h | 1.780 ± 0.036 ^{ab} |
| PF4处理 8 h | 1.594 ± 0.058 ^{ac} |

a为 $P < 0.05$ 与空白组比; b为 $P < 0.05$ 与 PF4处理 2 h比; c为 $P < 0.05$ 与 PF4处理 4 h比。

表 3 血小板因子 4处理内皮细胞不同时间其 Toll样受体 2 蛋白的表达 (n= 5)

| 分 组 | 蛋白 |
|------------|-----------------------------|
| 空白组 | 0.096 ± 0.026 |
| PF4处理 3 h | 0.219 ± 0.062 |
| PF4处理 6 h | 0.443 ± 0.064 ^a |
| PF4处理 12 h | 0.459 ± 0.054 ^{ab} |
| PF4处理 24 h | 0.273 ± 0.031 ^{ac} |

a为 $P < 0.05$ 与空白组比; b为 $P < 0.05$ 与 PF4处理 6 h比; c为 $P < 0.05$ 与 PF4处理 12 h比。

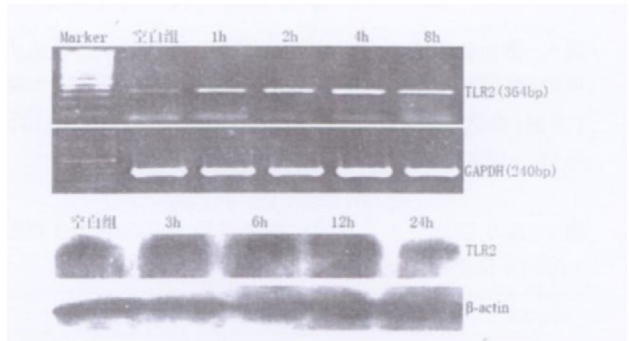


图 2 血小板因子 4处理内皮细胞不同时间其 Toll样受体 2 mRNA(上图)和蛋白(下图)表达情况

2.4 血小板因子 4促进内皮细胞表达 Toll样受体 2不受肝素抑制

采用 PF4最佳浓度处理内皮细胞,发现作用相应时间后内皮细胞 TLR2基因表达明显增加 ($P < 0.05$),其 TLR2蛋白表达亦如此 ($P < 0.05$, $n = 5$)。此外我们发现 PF4拮抗剂肝素 (0.2 ku/L)在基因和蛋白水平均不能抑制 PF4促 TLR2表达的功能,PF4+肝素组 TLR2 mRNA 无明显减少,与 LPS组相比其差异无统计学意义 ($P > 0.05$),而 TLR2蛋白表达量有所减少,但是与 LPS组相比差异也无统计学意义 ($P > 0.05$ 图 4和表 4)。

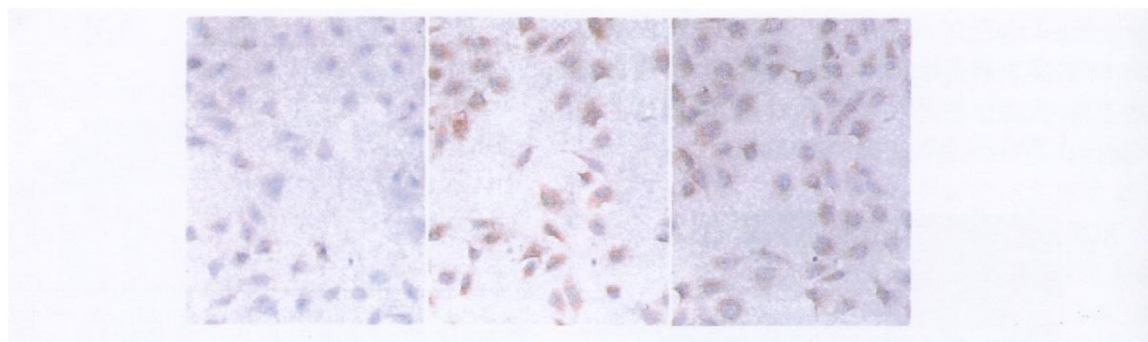


图 3 免疫组织化学法检测血小板因子 4(100 $\mu\text{g/L}$)处理 12 h 后内皮细胞 Toll 样受体 2 表达情况 从左到右依次为空白组、PF4 组和 LPS 组。

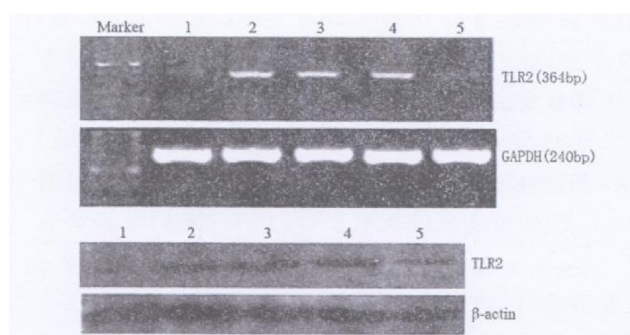


图 4 血小板因子 4 单独处理以及在血小板因子 4 拮抗剂共同处理情况下内皮细胞 Toll 样受体 2 mRNA (上图) 和蛋白 (下图) 表达 1 为空白组, 2 为 PF4 处理组, 3 为 LPS 处理组, 4 为 PF4+ 肝素处理组, 5 为肝素组。

表 4 血小板因子 4 及其拮抗剂处理后内皮细胞 Toll 样受体 2 mRNA 和蛋白表达

| 分 组 | mRNA | 蛋白 |
|----------|--------------------------------|--------------------------------|
| 空白组 | 0.060 \pm 0.021 | 0.069 \pm 0.051 |
| PF4 组 | 0.270 \pm 0.031 ^a | 0.317 \pm 0.030 ^a |
| LPS 组 | 0.242 \pm 0.025 ^a | 0.362 \pm 0.052 ^a |
| PF4+ 肝素组 | 0.279 \pm 0.035 ^a | 0.291 \pm 0.044 ^a |
| 肝素组 | 0.044 \pm 0.012 | 0.123 \pm 0.085 |

a 为 $P < 0.05$ 与空白组比较。

3 讨论

PF4 是血小板释放的一种细胞因子, 它被释放后可通过黏多糖结合于血管内皮细胞上, 对其发挥功能。Pitsilos 等^[7]报道在人动脉粥样硬化斑块内皮细胞 (包括新生血管内皮) 和巨噬细胞上表达 PF4。我们的研究也显示 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉斑块上可见 PF4 表达, 主要表达在内皮细胞和斑块肩部^[3], 同时发现 ApoE^{-/-} 小鼠粥样斑块中 TLR2 表

达上调, 并且 TLR2 主要表达在斑块的内皮细胞、巨噬细胞上。这说明 PF4 可能对内皮细胞 TLR2 的表达发挥作用。因此我们利用分子生物学的方法初步研究 PF4 对内皮细胞表达 TLR2 是否产生影响。

我们发现 100 $\mu\text{g/L}$ 的 PF4 即可有效促使内皮细胞 TLR2 mRNA 和蛋白表达, 而且 100 $\mu\text{g/L}$ PF4 促进 TLR2 表达具有一定时间依赖性。PF4 处理 2 h 即有 TLR2 mRNA 表达增高, 6 h TLR2 蛋白表达增强。利用 PF4+ 肝素 (0.2 $\mu\text{g/L}$) 处理, 并未见内皮细胞 TLR2 表达量减少。另外利用细胞免疫组织化学检测发现经 PF4 处理的内皮细胞胞浆中代表 TLR2 抗原的棕色颗粒明显增多。

PF4 是血小板 α 颗粒释放的一种蛋白质, 属于 CXC 趋化因子家族成员。血小板 α 颗粒中 25% 的蛋白质是 PF4, α 颗粒中 PF4 浓度大约为 1 500 mg/L ^[8], 它是血小板活化后释放最多的蛋白, 因此在血小板活化部位 PF4 的血浆浓度相对高。那么在某些血管炎症或动脉粥样硬化斑块等病理条件下, 血小板活化所释放的 PF4 水平足以发挥作用, 比如发挥其促进内皮细胞表达 TLR2 作用, 因为本实验显示较小浓度的 PF4 即可促进内皮细胞 TLR2 mRNA 和蛋白表达上调。PF4 作为一种趋化因子其半衰期较短, 但它可以迅速发挥作用, 在 2 至 4 h 的作用时间内即可有效促进内皮细胞 TLR2 mRNA 表达。动脉粥样硬化等炎症性疾病当中血小板处于活化状态, 在病变区域多种因素如炎症因子、剪切力、过氧化状态等持续存在, 都使血小板保持活化, 从而释放大量的生物活性物质, 此时数量众多的 PF4 有机会通过血流结合到病变处内皮细胞上, 与内皮细胞相互作用。

在 PF4 发挥各种细胞调节作用的过程中, 肝素具有重要作用, PF4 的许多作用都可被肝素所中和。

但是后来的研究显示高度保守的四赖氨酸区作为 PF4与肝素结合的强相关区域,却与 PF4及其相关多肽的抑制作用无关。有证据显示 PF4分子中心区存在一个“新”功能区为肝素非依赖性^[9]。本实验中肝素并没有起到抑制 PF4促内皮细胞表达 TLR2的作用,说明肝素所结合的 PF4区域可能不是 PF4发挥促 TLR2功能的部分。

综上所述,我们发现在体外实验中 PF4可促进内皮细胞表达 TLR2。最新观点认为 TLR 不仅参与动脉粥样硬化起始的信号传导,而且在动脉粥样硬化发生发展过程中亦发挥作用,在不稳定性斑块中各种因素如炎症及凋亡造成 TLR 迅速且显著起效可能加速了斑块的破裂^[10]。通过骨髓移植造成 TLR2缺乏的 LDL^{-/-}小鼠主动脉斑块面积明显减少^[4]。而对 ApoE^{-/-}小鼠给予 TLR2激动剂后,其主动脉斑块面积明显增加,TLR2^{-/-}小鼠则无此表现^[5],可见 TLR2发挥了极为重要的促动脉粥样硬化形成作用。血小板在血栓形成中扮演了重要的角色,目前的观点认为血小板还参与了动脉粥样硬化等炎症性疾病中炎症的发生发展,通过释放多种活性物质参与天然免疫甚至适应性免疫系统的调节。本实验亦提示血小板所释放的 PF4可能通过调节 TLR2表达而参与天然免疫,这为研究动脉粥样硬化中血小板参与炎症免疫提供了新思路。

[参考文献]

- [1] Sachais BS, Kuo A, Nassar T, et al. Platelet factor 4 binds to low-density lipoprotein receptors and disrupts the endocytic machinery, resulting in retention of low-density lipoprotein on the cell surface [J]. *Blood*, 2002; **99** (10): 3 613-622
- [2] Nassar T, Sachais BS, Akkawi S, et al. Platelet factor 4 enhances the binding of oxidized low-density lipoprotein to vascular wall cells [J]. *J Biol Chem*, 2003; **278** (8): 6 187-193
- [3] 金海燕, 彭茜, 顾洪丰, 等. 载脂蛋白 E基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块中血小板因子 4和 Toll样受体 2的表达 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007; **15** (6): 423-426
- [4] Mullick AE, Tobias PS, Curtiss LK. Modulation of atherosclerosis in mice by Toll-like receptor 2 [J]. *J Clin Invest*, 2005; **115** (11): 3 149-156
- [5] Schoneveld AH, Oude Nijhuis MM, van Middelkoop R, et al. Toll-like receptor 2 stimulation induces intimal hyperplasia and atherosclerotic lesion development [J]. *Cardiovasc Res*, 2005; **66** (1): 162-169
- [6] Cao F, Castrillo A, Tontonoz P, et al. Chlamydia pneumoniae-induced macrophage foam cell formation is mediated by Toll-like receptor 2 [J]. *Infect Immun*, 2007; **75** (2): 753-759
- [7] Pitsilos S, Hunt J, Mohler ER, et al. Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters [J]. *Thromb Haemost*, 2003; **90** (6): 1 112-120
- [8] Barber AJ, Kaser-Glanzmann R, Jakubova M, et al. Characterization of a chondroitin 4-sulfate proteoglycan carrier for heparin neutralizing activity (platelet factor 4) released from human blood platelets [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1972; **286**: 312-29
- [9] Lecomet-Raclet L, Alenamy M, Sequeria-Le Grand A, et al. New insights into the negative regulation of hematopoiesis by chemokine platelet factor 4 and related peptides [J]. *Blood*, 1998; **91**: 2 772-780
- [10] Balogh S, Kiss I, Csaszar A. Toll-like receptors link between "danger" ligands and plaque instability [J]. *Curr Drug Targets*, 2009; **10** (6): 513-518

(此文编辑 许雪梅)