

一种新型氧化型低密度脂蛋白配体 对人单核细胞趋化蛋白 1 表达的影响

陈子龙, 马光, 刘庆平

(大连大学生命科学与技术学院, 辽宁省大连市 116622)

[关键词] 7-酮基胆固醇-9-羧基壬烷; 氧化型低密度脂蛋白; THP-1 细胞; 单核细胞趋化蛋白 1

[摘要] **目的** 应用化学合成方法合成一种源于氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)的特异性配体—7-酮基胆固醇-9-羧基壬烷(oxLig-1),研究 oxLig-1 对 THP-1 细胞单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)表达的影响。**方法** 液相色谱质谱联用与核磁共振技术鉴定合成的 oxLig-1;不同浓度 oxLig-1 处理体外培养的人 THP-1 细胞;Annexin-V 和 PI 流式细胞术检测细胞凋亡;RT-PCR 检测细胞中 MCP-1 mRNA 水平;ELISA 检测各组细胞培养上清 MCP-1 蛋白水平。**结果** 化学合成方法纯化后的 oxLig-1 的结构经 LC-MS 及 NMR 分析后,证实化学结构正确;流式细胞术检测得出高浓度(60 mg/L) oxLig-1 对细胞凋亡无明显影响;RT-PCR 和 ELISA 检测 MCP-1 的表达量呈 oxLig-1 浓度依赖性,且 40 mg/L 时达最大值。**结论** oxLig-1 可以上调 THP-1 细胞中 MCP-1 的表达。

[中图分类号] Q5 [文献标识码] A

Effect of a Novel Ligand of ox-LDL on Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression in Human THP-1 Mononuclear Cells

CHEN Zi-Long, MA Guang, and LIU Qing-Ping
(Life Science and Biotechnology College of Dalian University, Dalian, Liaoning 116622, China)

[KEY WORDS] 7-Ketocholesteryl-9-Carboxynonanoate; Oxidized Low Density Lipoprotein; THP-1 Cells; Monocyte Chemoattractant Protein-1

[ABSTRACT] **Aim** To determine the effect of oxLig-1, synthesized by an chemical method, on the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression in human THP-1 monocytes. **Methods** oxLig-1 was identified by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance (NMR) analysis. Human THP-1 monocytes were treated with different concentration (15, 30 and 60 mg/L) of oxLig-1, the apoptosis of the cell was detected by flow cytometry using Annexin-V and PI. The mRNA and protein levels of MCP-1 were measured by RT-PCR and ELISA methods, respectively. **Results** The structure of synthetic oxLig-1 identified by LC-MS and NMR analysis showed the same as the natural structure of oxLig-1. There were no differences in THP-1 cell apoptosis, as evidenced by FCM at a high concentration of oxLig-1 (60 mg/L). The mRNA and protein expressions of MCP-1 were increased in a dose-dependent manner of oxLig-1, and the maximum value was observed at the concentration of 40 mg/L. **Conclusion** The oxLig-1 could upregulate the expression level of MCP-1 in human THP-1 cells.

目前认为动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)主要是一种包括细胞浸润、平滑肌细胞增殖、细胞外基质增加及血栓形成等多种病理过程的慢性炎症疾病^[1,2]。其中单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)使黏附于血管内皮细胞的外周血单核细胞迁入内皮下间隙进而分化为

巨噬细胞,病理性吞噬摄取氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)成为泡沫细胞,在 As 早期发挥了重要作用^[3,4]。MCP-1 是单核细胞向巨噬细胞转化的重要生化标志,也是 As 的炎症标志物^[5]。单核细胞中 MCP-1 在正常情况下表达量很少,当受到刺激或炎症因子作用下可上调

[收稿日期] 2012-10-23

[基金项目] 国家自然科学基金(30971232,81270361)资助

[作者简介] 陈子龙,硕士研究生,研究方向为脂类小分子介导的胆固醇逆转运,E-mail 为 faith_chen831@126.com。马光,硕士研究生,研究方向为生物分子信号传递与识别,E-mail 为 mag2006@163.com。通讯作者刘庆平,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向为动脉粥样硬化与血栓形成的细胞分子生物学研究,E-mail 为 qingpingliu40@126.com。

表达。研究表明,ox-LDL 能上调 MCP-1 的表达并使单核细胞迁入内皮下而分化为巨噬细胞^[6]。且 ox-LDL 可通过结合于血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 (lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1) 上调软骨细胞中 MCP-1 的表达^[7]。

ox-LDL 被认为是诱导 As 发生的独立危险因素,近年来其脂类组成成分如氧化磷脂^[8]、溶血卵磷脂^[9]、7-ketocholesterol^[10]、13-HODE^[11] 等与 As 发生发展相关的报道越来越多。2001 年, Kobayashi 等^[12]首次从 Cu²⁺ 氧化后的 ox-LDL 中通过薄层色谱、配体印记以及高效液相色谱法分离得到 7-酮基胆甾醇-9-羧基壬烷 (7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate, oxLig-1)。Liu 等^[13]通过液相色谱 (LC-MS) 及核磁共振 (NMR) 方法确定其正确的化学结构,并证明其结构中的 ω -COOH 团为生理活性中心。

前期我们利用 oxLig-1 处理巨噬细胞系 J774A.1,发现该化合物能够介导 ox-LDL 吞噬摄取进而使巨噬细胞转变为泡沫细胞^[13]。提示 oxLig-1 在由巨噬细胞转变为泡沫细胞过程中发挥了重要的作用,加快了泡沫细胞的形成和 As 发展进程。然而 oxLig-1 作为 ox-LDL 中的一种单一胆固醇亚油酸成分,能否像 ox-LDL 一样上调 MCP-1 的表达,对 As 的发生发展起到一定的作用,尚未见报道。本研究采用体外培养的人 THP-1 单核细胞,利用化学合成的 oxLig-1 刺激细胞,以观察 oxLig-1 对 MCP-1 表达的调节作用,为进一步认识 As 的发病机制提供相应的理论研究依据。

1 材料和方法

1.1 试剂和相关抗体

4-二甲氨基吡啶 (DMAP)、壬二酸、7-酮基胆甾醇 (7-KC) 购于 Sigma 公司;1,3-二环己基碳化二亚胺 (DCC) 购于 SCRC 公司;人单核细胞株 THP-1 购于中国典型培养物保藏中心;Trizol、青霉素、链霉素、胎牛血清购于 Invitrogen 公司。RPMI-1640 培养基购于 Gibco 公司;MCP-1 检测 ELISA 试剂盒购于 BPB 生物公司。

1.2 THP-1 细胞培养及给药方式

将人 THP-1 单核细胞悬浮于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中,另外加入 2 mmol/L 谷氨酰胺、10 mmol/L HEPES、0.05 mmol/L β -巯基乙醇、青霉素 100 kU/L 和链霉素 100 mg/L。每 3 天传代,接种量为 1×10^6 个细胞,在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中静置培养。在光学显微镜下可见细胞呈

球形,悬浮状态。视细胞生长情况进行传代、换液,选择生长良好的第 3 ~ 5 代细胞用于实验。

加药前,无血清培养基作用 12 h。细胞加药时,oxLig-1 用 DMSO 溶解,再按照加药浓度用培养基稀释。在本研究中的所有实验中,oxLig-1 原液均用 DMSO 配制,储液浓度为 10 g/L。作用细胞时,DMSO 终浓度小于 0.5%,在这一浓度下,DMSO 对细胞的增殖和正常生长无任何影响。且培养液中 0.05 mmol/L β -巯基乙醇对 oxLig-1 无直接作用。

1.3 oxLig-1 的化学合成及质谱和核磁共振分析

7-KC 和壬二酸溶于二氯甲烷,随后加入 DMAP 和 DCC。在室温反应后回流,最后过滤。粗产物经 NaHCO₃ 和 NaCl 萃取清洗,无水硫酸钠干燥,隔天蒸干。随后经硅胶柱层析纯化。LC-MS 和 NMR 分析确定其分子结构。质谱的测量范围为 100 ~ 800 m/z。合成的 oxLig-1 的质谱检测由 HP1100 (Agilent Technologies, USA) 完成。oxLig-1 的氢谱和碳谱的测量由 AVANCE 500 核磁共振仪 (Bruker, Switzerland) 完成。

1.4 流式细胞术检测细胞凋亡

取处于指数生长期的 THP-1 细胞按细胞密度每孔 1×10^6 接种于 6 孔板中,细胞经 12 h 无血清培养后,用不同浓度 oxLig-1 (0、15、30 及 60 mg/L) 处理 THP-1 细胞 12 h 后收集细胞,参照 PI, FITC-Annexin-V 双染法进行流式细胞仪 (Ex = 488 nm; Ex = 530 nm) 检测细胞增殖凋亡情况。

1.5 RT-PCR 检测 MCP-1 mRNA 表达

不同浓度 (0.5、10、20、30 及 40 mg/L) oxLig-1 作用 THP-1 细胞 12 h,提取总 RNA,RT-PCR 检测 MCP-1 mRNA 表达,MCP-1 上游引物 5'-TGT GCC TGC TGC TCA TAG-3',下游引物 5'-GTT TGG GTT TGC TTG TCC-3',产物 265 bp;GAPDH 上游引物 5'-TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG-3',下游引物 5'-TGC TCA GTG TAG CCC AGG AT-3',产物 616 bp,由 TaKaRa 公司合成。反应条件为 94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,50℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 40 s,30 个循环,72℃ 10 min 终止反应。GAPDH 退火温度 52℃。

1.6 ELISA 测定细胞 MCP-1 蛋白表达

用不同浓度 oxLig-1 (0.5、10、20 及 40 mg/L) 作用 THP-1 细胞不同时间 12 h,同组最大量 DMSO 作用细胞作为对照;低速离心 10 min,收集条件培养基,按 MCP-1 ELISA 检测试剂盒所提供的操作步骤对 MCP-1 表达量进行检测。在 450 nm 测定吸光值。

1.7 统计学方法

计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用 One-way ANOVA 分析,两组间比较采用 Student's *t* 检

验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 oxLig-1 的结构鉴定

oxLig-1 的结构通过氢谱、碳谱和场解析质谱分析证实 syn-oxLig-1 的结构为纯化的 oxlig-1, 产率为 80.4%, 纯度 $\geq 95\%$ (图 1)。

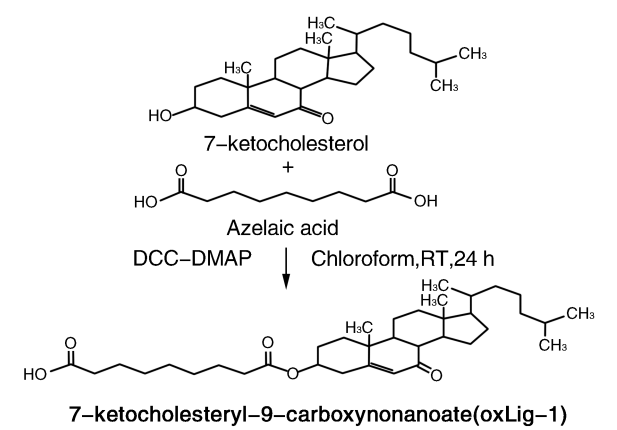


图 1. oxLig-1 的化学合成

Figure 1. The chemical synthesis of oxLig-1

2.2 oxLig-1 对 THP-1 细胞凋亡率的影响

用不同浓度 oxLig-1 (0、15、30 及 60 mg/L) 作用于 THP-1 细胞 12 h, 未发现 oxLig-1 对 THP-1 细胞凋亡有明显影响 (图 2)。

2.3 oxLig-1 对 MCP-1 mRNA 水平的影响

不同浓度 (0、5、10、20、30 及 40 mg/L) oxLig-1 作用于 THP-1 细胞 12 h, MCP-1 mRNA 表达水平明显上调, 且呈浓度依赖性 (图 3)。

2.4 oxLig-1 对 MCP-1 蛋白表达的影响

不同浓度 oxLig-1 刺激 THP-1 细胞 12 h 后, 与对照组比较, MCP-1 蛋白水平明显增加, 在 5 ~ 40 mg/L oxLig-1 作用范围内呈浓度依赖性 (表 1)。

表 1. 不同浓度 oxLig-1 刺激 THP-1 细胞 12 h MCP-1 的表达水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1. Effects of different concentration of oxLig-1 on protein expression of MCP-1 at 12 h ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

oxLig-1 浓度	MCP-1 (ng/L)
0 mg/L (对照组)	10.00 $\pm$ 0.94
5 mg/L	11.28 $\pm$ 0.98
10 mg/L	12.92 $\pm$ 1.16 ^a
20 mg/L	13.35 $\pm$ 1.51 ^a
40 mg/L	21.00 $\pm$ 1.67 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

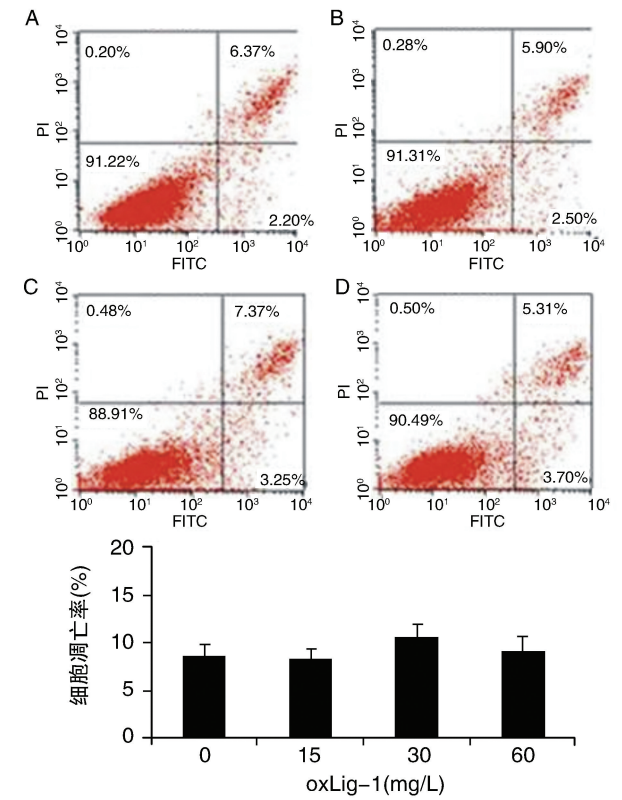


图 2. 不同浓度 oxLig-1 对培养的 THP-1 细胞凋亡率的影响
A 为 0 mg/L oxLig-1 组, B 为 15 mg/L oxLig-1 组, C 为 30 mg/L oxLig-1 组, D 为 60 mg/L oxLig-1 组。

Figure 2. The effects of differernt concentration of oxLig-1 on apoptotic ratio of cultured THP-1 cells

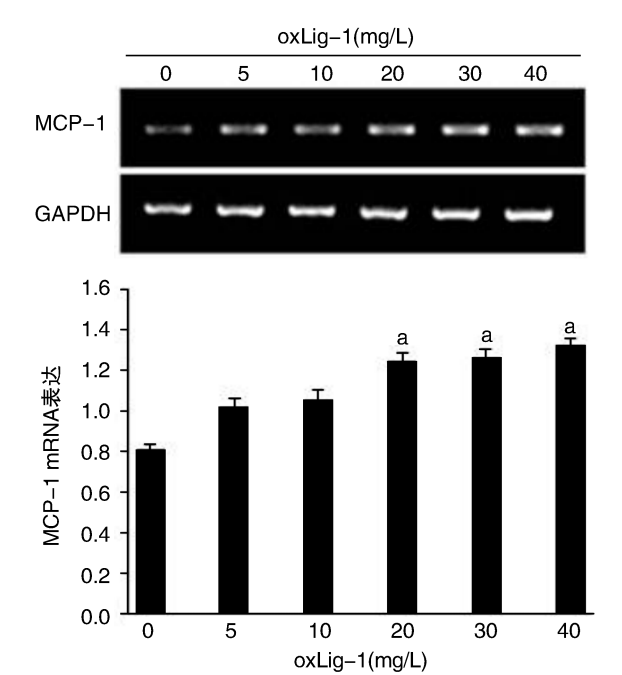


图 3. 不同浓度 oxLig-1 对 MCP-1 mRNA 表达的影响 ($n = 3$)
a 为 $P < 0.01$, 与对照组 (0 mg/L oxlig-1 组) 比较。

Figure 3. Effect of different concentration of oxLig-1 on the expression of MCP-1 mRNA

3 讨论

近年来, MCP-1 在 As 形成过程中的作用研究越来越多, 有资料表明^[14], 在 As 患者血管壁可见单核巨噬细胞及平滑肌细胞形成的泡沫细胞, 这两种泡沫细胞与 MCP-1 有密切关系。ox-LDL 上调黏附分子在血管内皮细胞的表达, 提高单核细胞黏附; 通过促进内皮细胞表达 MCP-1 或者直接发挥趋化作用, 吸引单核细胞向血管壁脂质堆积部位游走; 激活巨噬细胞内转录激活蛋白 1 (AP-1) 等转录因子, 上调清道夫受体表达, 清道夫受体无反馈调节地摄取修饰脂蛋白而形成泡沫细胞。单核细胞进入内膜后, 在氧化脂蛋白的刺激下可于短时间内释放大量的 MCP-1, 又使更多的单核细胞进入到内膜层分化为巨噬细胞, 形成一种类似“瀑布效应”样具有放大作用的恶性循环。由此可见, MCP-1 介导的单核细胞向内膜下迁移在 As 形成早期起关键作用。

oxLig-1, 最初是被 Matsuura 等作为载脂蛋白 H (又称 $\beta 2$ -糖蛋白 I) 与 ox-LDL 特异性结合的配体, 从 Cu^{2+} 氧化的天然 LDL 中通过薄层色谱, 配体印记以及高效液相色谱法分离得到的。它是 LDL 中亚油酸盐的氧化产物, 是致血栓性抗磷脂抗体 $\beta 2$ -GPI 识别 ox-LDL 的活性位点^[12,13]。我们通过质谱及核磁共振法分析了该配体的结构, 随后通过化学合成法得到较高数量和纯度的单一的 oxLig-1。并且通过抗体结合的酶联免疫实验也发现, 化学合成的 oxLig-1 具有与天然 oxLig-1 一样的结合活性。

前期研究发现, oxLig-1 能够被巨噬细胞系 J774A.1 吞噬摄取进而使其转变为泡沫细胞。泡沫细胞是 As 斑块的主要组成细胞。泡沫细胞的形成是 As 发生的关键事件和重要环节。提示 oxLig-1 促进了 As 的发生。此外, 在小鼠巨噬细胞 J774A.1 中, oxLig-1 能通过激活 NF- κ B 而上调相关炎症因子的表达, 从而加速了 As 进程^[15]。

本研究在上述基础上, 鉴于单核细胞在 MCP-1 作用下迁入内皮下间隙进而分化为巨噬细胞是 As 发生的始动环节, 本研究观察 ox-LDL 源性 oxLig-1 对 THP-1 细胞的影响, 发现 oxLig-1 能够明显上调 THP-1 细胞 MCP-1 的表达, 表明 oxLig-1 对 As 早期单核细胞向内膜下迁移并分化成巨噬细胞到最后发生泡沫细胞形成可能具有重要作用。此研究为 ox-LDL 及其氧化脂类亚成分对 As 及血栓形成的发病机制提供了理论研究依据, 而 oxLig-1 是否通过细胞内 NF- κ B 的活化来调节 MCP-1 的表达需要进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340 (2): 115-126.
- [2] Anogeianaki A, Angelucci D, Cianchetti E, et al. Atherosclerosis: a classic inflammatory disease [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2011, 24 (4): 817-825.
- [3] Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2009, 29 (6): 313-326.
- [4] Niu J, Kolattukudy PE. Role of MCP-1 in cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2009, 117 (3): 95-109.
- [5] Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. Monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 as a biomarker in acute coronary syndromes [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2009, 11 (2): 131-138.
- [6] Li D, Mehta JL. Antisense to LOX-1 inhibits oxidized LDL-mediated upregulation of monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion to human coronary artery endothelial cells [J]. *Circulation*, 2000, 101 (25): 2 889-895.
- [7] Akagi M, Ueda A, Teramura T, et al. Oxidized LDL binding to LOX-1 enhances MCP-1 expression in cultured human articular chondrocytes [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009, 17 (2): 271-275.
- [8] Bochkov VN, Oskolkova OV, Birukov KG, et al. Generation and biological activities of oxidized phospholipids [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12 (8): 1 009-059.
- [9] Schmitz G, Ruebsaamen K. Metabolism and atherogenic disease association of lysophosphatidylcholine [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 208 (1): 10-18.
- [10] Biasi F, Leonarduzzi G, Vizio B, et al. Oxysterol mixtures prevent proapoptotic effects of 7-ketocholesterol in macrophages: implications for proatherogenic gene modulation [J]. *FASEB J*, 2004, 18 (6): 693-695.
- [11] Natarajan R, Reddy MA, Malik KU, et al. Signaling mechanisms of nuclear factor-kappaB-mediated activation of inflammatory genes by 13-hydroperoxyoctadecadienoic acid in cultured vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21 (9): 1 408-413.
- [12] Kobayashi K, Matsuura E, Liu Q, et al. A specific ligand for beta (2)-glycoprotein I mediates autoantibody-dependent uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages [J]. *J Lipid Res*, 2001, 42 (5): 697-709.
- [13] Liu Q, Kobayashi K, Furukawa J, et al. Omega-carboxyl variants of 7-ketocholesteryl esters are ligands for beta (2)-glycoprotein I and mediate antibody-dependent uptake of oxidized LDL by macrophages [J]. *J Lipid Res*, 2002, 43 (9): 1 486-495.
- [14] Barlic J, Murphy PM. An oxidized lipid-peroxisome proliferator-activated receptor gamma-chemokine pathway in the regulation of macrophage-vascular smooth muscle cell adhesion [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2007, 17 (8): 269-274.
- [15] Huang Z, Li W, Wang R, et al. 7-ketocholesteryl-9-carboxynonanoate induced nuclear factor-kappa B activation in J774A.1 macrophages [J]. *Life Sci*, 2010, 87 (19-22): 651-657.

(此文编辑 文玉珊)