

# 亲环素 A 启动单核细胞炎症性募集的机制

袁伟, 严金川, 梁仪, 王中群, 吴骏, 陈小节, 周红

(江苏大学附属医院心内科, 江苏省镇江市 212001)

[关键词] 亲环素 A; THP-1 单核细胞; 炎症

[摘要] **目的** 探讨亲环素 A 在单核细胞参与氧化应激炎症反应中的作用。**方法** 人类单核细胞系 THP-1 细胞常规体外培养,以亲环素 A 作为氧化应激炎症反应的主要活性氧诱导刺激因子,Transwell 法检测亲环素 A 对单核细胞迁移趋化的影响;ELISA 检测单核细胞培养液中主要炎症反应因子白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 的含量变化;明胶酶谱法测定基质金属蛋白酶 9(MMP-9)的活性变化;Western blot 检测核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)炎症信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)炎症信号通路的激活。**结果** 亲环素 A 可以诱导单核细胞迁移趋化,促进单核细胞分泌炎症反应因子 IL-6;亲环素 A 通过 MAPK-NF- $\kappa$ B 炎症信号通路增强 MMP-9 活性。**结论** 亲环素 A 诱导单核细胞迁移趋化,促进单核细胞分泌炎症因子,显示了其启动单核细胞炎症性募集的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Mechanism of Cyclophilin A Initiating the Inflammatory Recruitment of Monocytes

YUAN Wei, YAN Jin-Chuan, LIANG Yi, WANG Zhong-Qun, WU Jun, CHEN Xiao-Jie, and ZHOU Hong

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

[KEY WORDS] Cyclophilin A; THP-1 Cell; Inflammation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of cyclophilin A (CypA) in the inflammatory response of monocytes.

**Methods** Human monocytic cell line THP-1 cells were cultured. Human recombinant CypA was added as indicated. Chemotactic activity was assessed in transwell chamber. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) were detected by ELISA. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity was determined by gel zymography. The protein expression of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) were detected by Western blot.

**Results** CypA strongly induced migration of monocytes and the expression of MMP-9, IL-6. The cascade of ERK-NF- $\kappa$ B was the main signaling pathway for CypA-induced MMP-9 production in monocytes/macrophages. **Conclusions** CypA induced migration of monocytes and the expression of pro-inflammatory cytokines. These findings suggest that pro-inflammatory activities are induced by CypA in monocytes.

炎症是临床常见的一个病理过程,动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)也是血管壁对各种损伤过度应答引起的慢性炎症过程<sup>[1,2]</sup>。血管内皮的早期损伤和血管炎症的持续与众多因素有关,在此过程中,氧化应激(oxidative stress, OS)产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS)是 As 血管炎症级联反应上游的关键驱动因素<sup>[3]</sup>。由 ROS 诱导产生的一些反应介质被认为是连接 ROS 和 As 的桥梁,并被称为分泌氧化应激诱导因子(secreted oxidative

stress-induced factor, SOXF)。亲环素 A(cyclophilin A, CypA)为亲环素家族成员之一,一个广泛表达于从原核细胞到人类的细胞胞浆蛋白,被认为是对 As 的氧化应激和炎症反应的主要的 SOXF<sup>[4]</sup>。正常情况下, CypA 是位于细胞内的胞浆蛋白,在应对 ROS 的反应过程中, CypA 能够从单核细胞/巨噬细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞分泌到细胞外发挥重要生物学作用<sup>[5,6]</sup>。已经在一些炎症中发现 CypA 的表达水平升高,说明其在 ROS 诱导的血管炎症中

[收稿日期] 2013-03-04

[基金项目] 国家青年自然科学基金(81200222);镇江市社会发展支撑项目(SH2011053)

[作者简介] 袁伟,博士,主治医师,硕士研究生导师,主要从事动脉粥样硬化的机制研究, E-mail 为 yuanwei\_1006@ yahoo.com.cn。通讯作者严金川,博士,教授,博士研究生导师,主要从事急性冠状动脉综合征的基础和临床研究, E-mail 为 jin-chuanyan@yahoo.com。梁仪,硕士,主治医师,主要从事动脉粥样硬化的机制研究。

CypA 具有潜在作用<sup>[7]</sup>。研究发现,细胞外 CypA 不仅能够刺激内皮细胞分泌血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 和 E 选择素<sup>[8]</sup>,并且刺激平滑肌细胞增殖和迁移<sup>[9]</sup>。但是 CypA 与单核细胞/巨噬细胞的相关作用研究甚少,本研究旨在探讨 CypA 在单核细胞参与炎症反应中的作用及其调控方式。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料和试剂

人单核细胞系 THP-1 细胞(ATCC, USA)购自中科院上海细胞库;人体外重组 CypA 蛋白购自 Alexis Biochemicals 公司;细胞 Transwell 迁移盒购自 Corning 公司;RPMI1640 细胞培养基购自 Gibco 公司;胎牛血清购自 Hyclone 公司;10% 明胶、PD98059 (ERK1/2 抑制剂)购自 Sigma 公司;环孢霉素 A (CsA, CypA 活性抑制剂)购自 Bio Basic Inc 公司;IL-6、TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒购自 NeoBioscience 公司;总蛋白提取试剂 RIPA 购自上海生工公司;细胞核蛋白抽提试剂盒购自碧云天公司;Western blot 检测用 ECL 试剂盒、蛋白定量试剂盒购自 Pierce 公司;硝酸纤维素膜购自 Biorad 公司;ERK1/2 抗体、磷酸化 ERK1/2 抗体、p38MAPK 抗体、磷酸化 p38MAPK 抗体、JNK 抗体、磷酸化 JNK 抗体购自 Cell Signal 公司;IkB $\alpha$  抗体购自 Genetex 公司;EMMPRIN 抗体、 $\beta$ -actin 抗体购自 Abcam 公司;p65 抗体、histone 抗体、GDPH 抗体、山羊抗兔、抗鼠的 HRP 偶联二抗购自 Santa Cruz 公司;其他为国产分析纯试剂。

### 1.2 细胞培养

THP-1 细胞以 RPMI1640 细胞培养基 + 10% FBS 培养,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下,2 ~ 3 天传代一次。

### 1.3 明胶酶谱法检测 MMP-9 活性

不同组细胞以每孔  $1.5 \times 10^6$  接种于 6 孔板,共同孵育 36 h。收获细胞培养液,以 600 r/min 离心 5 min,取上清。将上清样品进行 SDS-PAGE(含 0.1% 明胶)电泳分离。电泳结束后,将凝胶置于洗脱液中振荡洗脱 2 次,每次 40 min,然后用漂洗液漂洗 2 次,每次 20 min,接着,将凝胶置于孵育液中 37 $^{\circ}$ C 孵育 18 ~ 24 h。孵育结束后经染色液染色 3 h,以及脱色液 A、B、C(甲醇浓度分别为 30%、20%、10%,乙酸浓度分别为 10%、10%、5%)分别脱色 0.5、1、2 h 后,显示出 MMP-9(92 kDa)为位于蓝色背景上的透亮带。最后用凝胶图像分析系统分析读取条带面

积、宽度和灰度值,再进行统计分析。

### 1.4 细胞迁移实验检测 THP-1 细胞的迁移趋化

Transwell 细胞迁移盒为含有 8  $\mu$ m 孔径 PVDF 膜分开的上下两个小室。上层小室加入  $3 \times 10^4$  个 THP-1 细胞在含 1% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,而人重组 CypA 加到下层小室的培养基中。迁移盒置于 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中孵育 45 min。显微镜下观察计数迁移到下层小室的细胞数量,计算迁移指数。

### 1.5 ELISA 检测炎症细胞因子水平

细胞以每孔  $1.0 \times 10^6$  接种于 6 孔板,分空白组和 CypA 组。收获细胞培养液,以 600 r/min 离心 5 min,取上清。用 ELISA 测定细胞培养上清液中 IL-6、TNF- $\alpha$  水平,每个样品设置 3 个复孔,具体操作步骤按试剂盒说明。酶标仪在 450 nm 下读取吸光值,根据标准品的浓度和对应的吸光值绘制标准曲线,根据标准曲线和吸光值计算每个样品相应的浓度。

### 1.6 Western blot 检测 NF- $\kappa$ B 和 MAPK 信号分子

实验分空白组、CypA 组和 CypA + CsA 组。取 50  $\mu$ g 蛋白,加入等体积的 2  $\times$  SDS 凝胶上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 加热 5 min,12000 g 离心 1 min 后电泳。电泳结束后,将胶条割至合适大小,用转膜缓冲液平衡,5 min  $\times$  3 次;预先裁好与胶条同样大小的 Whatman 3 mm 滤纸 2 张和 NC 膜 1 张,浸入转膜缓冲液中 10 min,倒入电转液,接通电源,100 v 1 h。封闭液 30 mL 与 NC 膜共同孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜或室温下摇床孵育 1 h,然后 TBS 冲洗 NC 膜,5 min  $\times$  3 次。NC 膜与一抗共同孵育,4 $^{\circ}$ C 过夜;TBST 漂洗 NC 膜,5 min  $\times$  3 次;NC 膜与辣根过氧化物酶偶联的二抗共同孵育,室温下摇床孵育 2 h;TBST 漂洗 NC 膜,5 min  $\times$  3 次。在自封袋内放 ECL 试剂盒的显色剂 A 和 B 各 1 mL,放入 NC 膜,室温孵育 1 min,沥干膜,将膜放入压片盒,放入相同大小的胶片,曝光,取出胶片,放入冲片机中。

### 1.7 统计学方法

所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析及 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CypA 对单核细胞迁移趋化的影响

Transwell 下层小室中加入 0  $\mu$ g/L、100  $\mu$ g/L 及 200  $\mu$ g/L CypA,孵育箱孵育 45 min 后检测迁移到下层小室的单核细胞数量。结果发现,CypA 对单核细胞具有显著的迁移趋化作用,并且在 CypA 浓度为 100  $\mu$ g/L 时作用效果最大(图 1)。

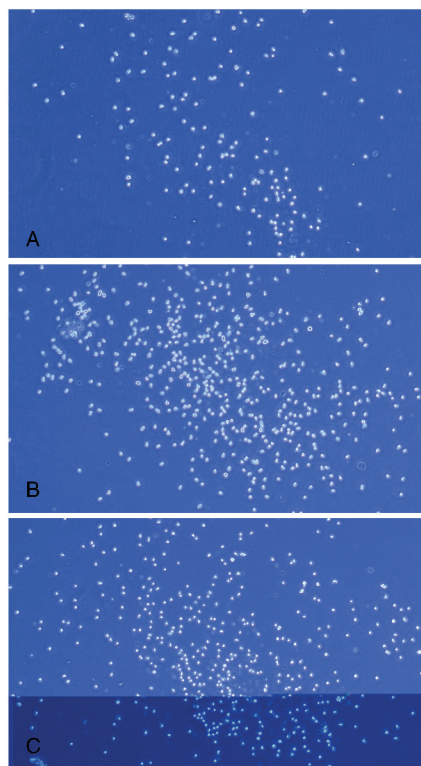


图 1. CypA 诱导单核细胞迁移趋化 (四倍镜) A 为空白组, B 为 100 μg/L CypA 组, C 为 200 μg/L CypA 组。

Figure 1. CypA induced THP-1 migration

### 2.2 CypA 对单核细胞 MMP-9 活性的影响

THP-1 细胞用 200 μg/L CypA 刺激 36 h 后, 提取细胞培养上清液用明胶酶谱法检测 MMP-9 活性的变化。结果发现, 单核细胞经 CypA 刺激 36 h 后, MMP-9 活性明显增强 (图 2)。

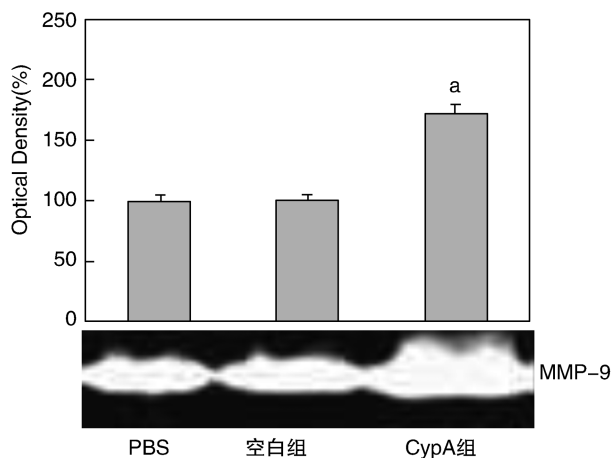


图 2. CypA 对 MMP-9 活性的影响 (n = 3) a 为 P < 0.05, 与空白组比较。

Figure 2. Effect of CypA on MMP-9 activity

### 2.3 CypA 对单核细胞 IL-6 和 TNF-α 表达的影响

THP-1 细胞用 0.5% FBS-RPMI 培养 24 h, 再用

200 μg/L CypA 刺激 24 h 后, 提取细胞培养上清液用 ELISA 检测 IL-6、TNF-α 表达的变化。结果发现, 单核细胞经 CypA 刺激 24 h 后, IL-6 的表达明显增加, 但对 TNF-α 的表达没有影响 (图 3)。

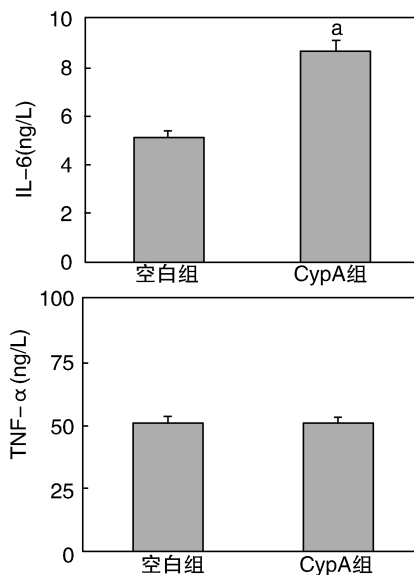


图 3. CypA 对单核细胞分泌 IL-6 和 TNF-α 的影响 (n = 5) a 为 P < 0.05, 与空白组比较。

Figure 3. Effects of CypA on secretion of IL-6 and TNF-α in THP-1 cells

### 2.4 CypA 对 NF-κB 信号通路的影响

200 μg/L CypA 刺激单核细胞, 在不同时间段 (0、30、60 及 120 min) 收集细胞, 提取细胞总蛋白及细胞核蛋白, 行 Western blot 检测。结果发现, CypA 在 120 min 内可以逐渐激活 NF-κB 通路, 即 IκB 磷酸化后迅速降解 (图 4), 同时伴随 p65 的转核 (图 5), 在 120 min 达到高峰。给予 CypA 活性抑制剂 CsA 预处理 CypA 后, 这一作用结果消失 (图 6), 说明 NF-κB 通路的激活确实由 CypA 作用产生。

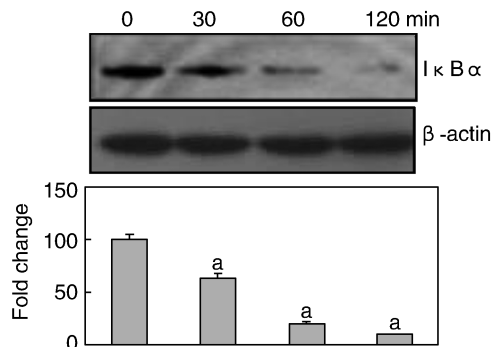


图 4. CypA 对 IκBα 的表达影响 (n = 3) a 为 P < 0.05, 与 0 min 时相比。

Figure 4. Effects of CypA on IκBα protein expression in THP-1 cells

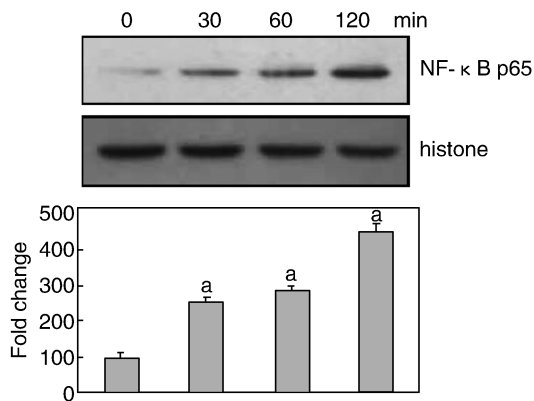


图 5. CypA 对 p65 的表达影响 ( $n=3$ ) a 为  $P<0.05$ , 与 0 min 时相比。

Figure 5. Effects of CypA on p65 protein expression in THP-1 cells

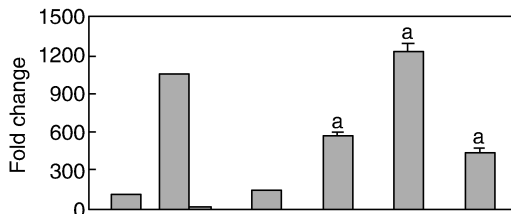
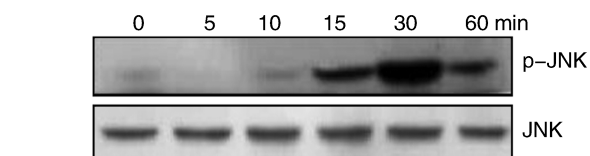
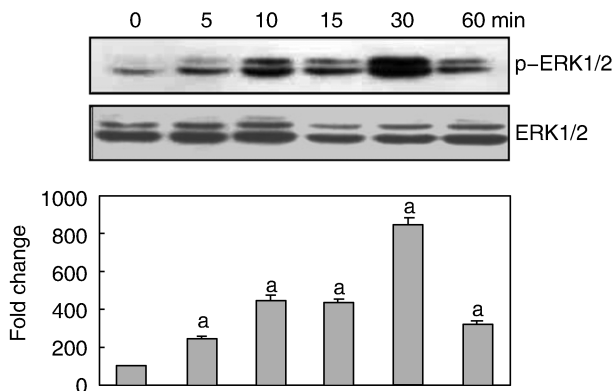


图 7. CypA 对 MAPK 通路的影响 ( $n=3$ ) a 为  $P<0.05$ , 与 0 min 时相比。

Figure 7. Effects of CypA on MAPK signaling pathway in THP-1 cells

## 2.6 CypA 通过 ERK 信号通路激活 NF-κB 通路及增加 MMP-9 活性

THP-1 细胞预先给予 ERK1/2 通路抑制剂 PD98059 预处理 2 h, 然后再给予 CypA 刺激。2 h 后收集细胞, 分别提取细胞总蛋白, 行 Western blot 检测 NF-κB 通路激活蛋白表达; 36 h 后, 提取细胞培养上清液用明胶酶谱法检测 MMP-9 活性的变化。结果显示, ERK1/2 通路抑制剂 PD98059 抑制了 CypA 对 NF-κB 通路的激活作用 (图 8) 及 CypA 对单核细胞 MMP-9 活性增强的作用 (图 9)。

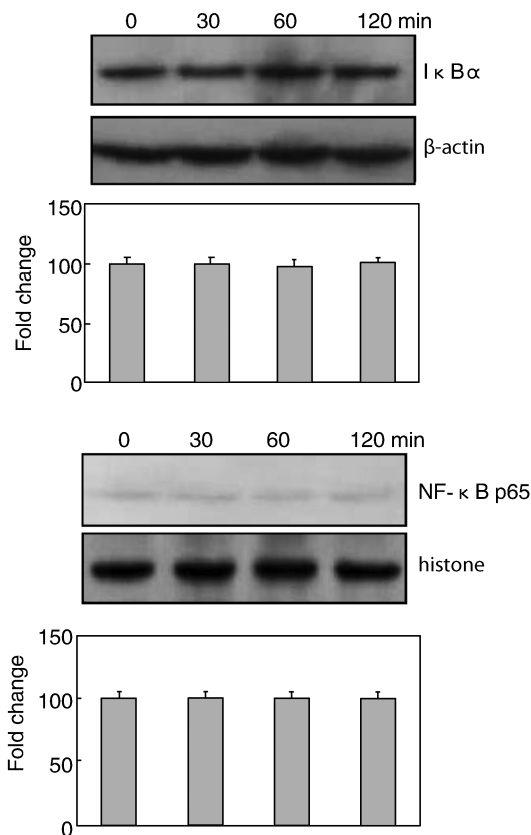


图 6. CsA 抑制 CypA 对 NF-κB 通路的激活 ( $n=3$ )

Figure 6. Effects of CsA on CypA activated NF-κB in THP-1 cells

## 2.5 CypA 对 MAPK 信号通路的影响

给予 200 μg/L CypA 刺激单核细胞, 在不同时间段 (0、5、10、15、30 及 60 min) 收集细胞, 提取细胞总蛋白, 行 Western blot 检测。结果发现, CypA 在 60 min 内可以激活 MAPK 通路, 包括 ERK1/2、JNK、p38 三条主要通路, 并在 30 min 达到高峰 (图 7)。

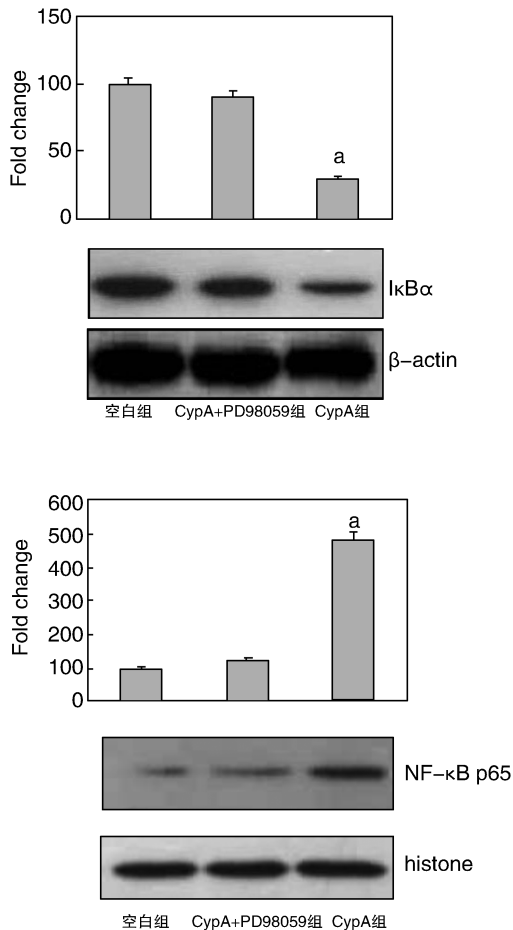


图 8. CypA 通过 ERK1/2 通路激活 NF-κB 通路 ( $n=3$ )

a 为  $P < 0.05$ , 与 medium 组相比。

Figure 8. CypA activated NF-κB via ERK signaling pathway

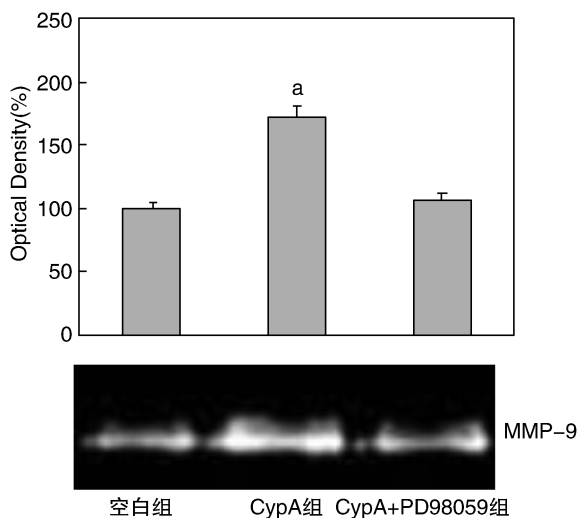


图 9. CypA 通过 ERK1/2 通路增强 MMP-9 活性 ( $n=3$ )

a 为  $P < 0.05$ , 与 medium 组相比。

Figure 9. CypA activated MMP-9 activity via ERK signaling pathway

### 3 讨论

炎症相关性疾病—As 病理生理进程中,氧化应激是细胞损伤的主要原因,ROS 激活炎症信号转导通路,启动炎症基因的表达,引起 As 慢性炎症反应<sup>[10]</sup>;而炎症基因的启动,则会进一步促进氧化应激的瀑布链,形成恶性循环,进一步加剧 As 进程,并诱发斑块不稳定和破裂。

最近的一些研究发现,在 As 的炎症反应进程中,被认为是主要的氧化应激分泌因子之一的 CypA 表达显著增加<sup>[8,9,11]</sup>,斑块中的单核细胞、平滑肌细胞、内皮细胞在 ROS 刺激下产生大量的 CypA,此外,斑块坏死核心中死亡的细胞是 CypA 的另一个重要的来源<sup>[12]</sup>。本研究中,CypA 对单核细胞具有显著的迁移趋化作用,说明斑块中 CypA 可以加速单核细胞向 As 斑块中的浸润并分化形成巨噬细胞,从而参与介导 As 病灶区炎症反应。诸多证据表明,巨噬细胞来源的泡沫细胞更是构成 As 病变的重要组成部分,对 As 的发生和发展具有关键作用<sup>[13]</sup>。我们同时发现 CypA 诱导单核细胞分泌 IL-6 明显增加,使单核细胞 MMP-9 活性明显增强。MMP-9 是可降解细胞外基质的蛋白水解酶,CypA 增强单核细胞分泌 MMP-9 活性这一作用在炎症细胞向血管内皮层下的迁移进程中具有十分重要的作用,因为参与 As 形成的炎症细胞迁移到血管内皮下首先需要 MMP 对血管外细胞基质的消化,从而更利于炎症细胞向斑块中聚集,加速了 As 斑块的形成及不稳定性的增加,MMP 同时还能够降解粥样斑块周围的纤维帽,因此在斑块破裂中具有关键的作用<sup>[14,15]</sup>。

进一步研究发现,CypA 能够激活单核细胞中参与炎症反应的关键性炎症信号通路—NF-κB 信号通路和 MAPK 信号通路;使用 ERK1/2 通路特异性抑制剂 PD98059 预处理细胞后,阻断了 CypA 诱导的 IκBα 的降解和 p65 的转核,表明了 NF-κB 通路在 ERK1/2 通路的下游。NF-κB 是一个重要的转录诱导因子,本研究予以 CypA 刺激单核细胞后,较短时间内即出现 IκBα 的降解及同时伴有的 p65/p50 的转核,提示 CypA 能激活 NF-κB 炎症信号途径,而给予 CsA 抑制 CypA 活性后这一激活作用消失,这更加证明了 NF-κB 的激活确实是由 CypA 作用所致。同时发现,予以 CypA 刺激单核细胞后,较短时间内便出现磷酸化的 ERK1/2、JNK、p38MAPK 表达增加,提示 MAPK 信号通路同样参与了 CypA 的促炎症作用。而使用 ERK1/2 通路特异性抑制剂 PD98059 预处理细胞后,阻断了 CypA 诱导的 IκBα

降解和 p65 转核,表明 NF- $\kappa$ B 通路是在 ERK1/2 通路的下游,Western blot 也表明 ERK1/2 的激活时间的确先于 NF- $\kappa$ B 激活时间。更为重要的是使用 PD98059 预处理细胞后,MMP-9 活性增强这一作用也被抑制,说明 CypA 是通过 ERK1/2-NF- $\kappa$ B 信号通路来增强 MMP-9 活性的。

综上所述,在单核细胞中,CypA 能促进炎症细胞因子的分泌,诱导单核细胞迁移趋化,充分显示了其促进炎症反应的作用,推测其在 As 炎症反应进程中也具有重要的作用。研究表明 CypA 增强单核细胞 MMP-9 的活性是由于激活了 NF- $\kappa$ B 信号通路和 MAPK 信号通路。细胞外 CypA 主要由 ROS 诱导产生,本研究表明其参与了 ROS 对炎症信号转导通路的激活及对炎症基因的启动,CypA 对炎症信号通路的激活又促进了更多的 ROS 产生<sup>[16]</sup>,从而进一步放大 ROS-CypA-ROS 炎症反应效应,整个级联反应加速了炎症反应的进程。如果能够找到一个合适的靶点来阻断这一级联反应,则有可能会延缓炎症相关性疾病,如 As 进程。

#### [参考文献]

- [1] 夏妍,杨永宗. IFN $\gamma$  在动脉粥样硬化形成中的作用[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2008, 28: 118-121.
- [2] 王燕,杨永宗. 炎症反应在动脉粥样硬化发病学中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11: 706-708.
- [3] Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS[J]. Circulation, 2003, 108: 1 912-916.
- [4] Liao DF, Jin ZG, Baas AS, et al. Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275: 189-196.
- [5] Kim SH, Lessner SM, Sakurai Y, et al. Cyclophilin A as a novel biphasic mediator of endothelial activation and dysfunction[J]. Am J Pathol, 2004, 164 (5): 1 567-574.
- [6] Suzuki J, Jin ZG, Meoli DF, et al. Cyclophilin A is secre-

ted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells [J]. Circ Res, 2006, 98 (6): 811-817.

- [7] Satoh K, Matoba T, Suzuki J, et al. Cyclophilin A mediates vascular remodeling by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation[J]. Circulation, 2008, 117: 3 088-098 .
- [8] Jin ZG, Lungu AO, Xie L, et al. Cyclophilin A is a proinflammatory cytokine that activates endothelial cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24 (7): 1 186-191.
- [9] Jin ZG, Melaragno MG, Liao DF, et al. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress[J]. Circ Res, 2000, 87: 789-796.
- [10] Oliveira HC, Cosso RG, Alberici LC, et al. Oxidative stress in atherosclerosis-prone mouse is due to low antioxidant capacity of mitochondria[J]. FASEB J, 2005, 19: 278-280.
- [11] Satoh K, Matoba T, Suzuki J, et al. Cyclophilin A mediates vascular remodeling by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation [J]. Circulation, 2008, 117: 3 088-098.
- [12] Galat A. Peptidylproline cis-trans-isomerases: immunophilins [J]. Eur J Biochem, 1993, 216 (3): 689-707.
- [13] Arora K, Gwinn WM, Bower MA, et al. Extracellular cyclophilins contribute to the regulation of inflammatory responses[J]. J Immunol, 2005, 175: 517-522.
- [14] Takahashi K, Takeya M, Sakashita N. Multifunctional roles of macrophages in the development and progression of atherosclerosis in humans and experimental animals [J]. Med Electron Microsc, 2002, 35 (4): 179-203.
- [15] 袁伟,何奔,葛恒. 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子在动脉粥样硬化发展进程中的相关研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16 (7): 582-584.
- [16] Satoh K, Nigro P, Berk BC. Oxidative stress and vascular smooth muscle cell growth: a mechanistic linkage by cyclophilin A[J]. Antioxid Redox Signal, 2010, 12 (5): 675-682.

(此文编辑 文玉珊)