

•实验研究•

[文章编号] 1007-3949(2000)-04-0322-05

单核细胞趋化蛋白-1 对其表面淋巴细胞功能相关抗原-1、清道夫受体和载脂蛋白 E 表达的影响及雌二醇的干预作用

胡厚源, 陈运贞

(重庆医科大学附属第一医院心内科, 重庆 400016)

[关键词] 单核细胞趋化蛋白-1; 雌二醇; 单核细胞; 淋巴细胞功能相关抗原-1; 受体; 载脂蛋白 E; 动脉粥样硬化

[摘要] 为研究单核细胞趋化蛋白-1 对单核细胞表面淋巴细胞功能相关抗原-1、清道夫受体和载脂蛋白 E 表达的影响, 采用培养人单核细胞株 THP-1 细胞, 以间接免疫荧光法结合流式细胞术和激光共聚焦扫描显微镜分别检测淋巴细胞功能相关抗原-1 和清道夫受体蛋白的表达, 用逆转录-多聚酶链反应检测清道夫受体和载脂蛋白 E mRNA 的表达水平。结果显示, 在单核细胞趋化蛋白-1 刺激组淋巴细胞功能相关抗原-1 和清道夫受体蛋白的表达明显高于对照组 ($P < 0.01$); 17- β -雌二醇可部分抑制单核细胞趋化蛋白-1 对 THP-1 细胞表面淋巴细胞功能相关抗原-1 表达的促进作用 ($P < 0.05$), 但对单核细胞趋化蛋白-1 促进清道夫受体表达的作用无明显影响; 单核细胞趋化蛋白-1 明显促进 THP-1 细胞清道夫受体 mRNA 的表达, 而对载脂蛋白 E mRNA 的表达无明显影响。研究提示, 单核细胞趋化蛋白-1 可通过促进单核细胞表面粘附分子、淋巴细胞功能相关抗原-1 以及清道夫受体的表达而促进动脉粥样硬化的发生, 雌二醇还可能通过抑制单核细胞趋化蛋白-1 对淋巴细胞功能相关抗原-1 表达的促进而发挥抗动脉粥样硬化作用。

[中图分类号] R322.74

[文献标识码] A

Effects of MCP-1 and 17- β -Estradiol on the Expression of LFA-1, SR and Apolipoprotein E on THP-1 Cells

HU Hou-Yuan, and CHEN Yun-Zhen

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

MeSH Monocyte Chemoattractant Protein-1; Estradiol; Monocytes; Lymphocyte Function Associated Antigen-1; Receptor; Apolipoprotein E; Atherosclerosis

ABSTRACT **Aim** To study the effect of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and 17- β -estradiol (E2) on the expression of lymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1), scavenger receptor (SR) and apolipoprotein E (apoE) by monocytes. **Methods** THP-1 cells (a human acute monocytic leukemia cell line) were cultured for the experiments.

The protein expression of LFA-1 and SR on THP-1 cells were assayed by indirect immunofluorescence combined with flow cytometry and confocal laser scanning microscopy respectively. The monoclonal antibody of SR was 2F8 (rat anti mouse macrophage SR). The mRNA expression of SR and apoE in THP-1 cells was determined by reverse transcription-PCR (RT-PCR).

Results MCP-1 could stimulate the expression of LFA-1 on THP-1 cells, the positive cell rate in MCP-1 group and control group were $66.1\% \pm 2.5\%$ and $43.3\% \pm 3.7\%$ ($P < 0.01$), the mean fluorescence intensity (MFI) were 221.3 ± 17.8 and 132.8 ± 18.7 respectively ($P < 0.01$). The positive cell rate and MFI in MCP-1 + E2 group were $59.5\% \pm 2.1\%$ and 204.2 ± 22.5 ($P < 0.05$ versus MCP-1 group), respectively. MCP-1 also stimulated the protein expression of SR on THP-1 cells, the net fluorescence intensity (NFI) in MCP-1 group and control group were 48.9 ± 9.8 and 32.5 ± 3.2 respectively ($P < 0.01$), the NFI in MCP-1 + E2 group were 49.7 ± 10.4 ($P > 0.05$ versus MCP-1 group). The RT-PCR also showed that MCP-1 could induce the mRNA expression of SR on monocytes, but doesn't have obvious effects on apoE expression.

Conclusions By increasing the expression of LFA-1 on monocytes, MCP-1 can promote the monocyte-endothelium adhesion. MCP-1 also induces the expression of SR on monocytes, but doesn't have obvious effects on apoE expression, therefore

[作者简介] 胡厚源, 男, 1966 年出生, 湖北省荆州市人, 内科学心血管病专业博士, 副主任医师、副教授, 现从事冠心病的临床和基础研究, 发表论文 10 篇, 获重庆市科技进步三等奖 1 项。现在第三军医大学西南医院心内科 (重庆 400038)。陈运贞, 女, 1934 年出生, 上海市人, 内科主任医师、教授、博士生导师, 主要从事冠心病的临床和基础研究, 发表论文 30 余篇, 获四川省科技进步二等奖和重庆市科技进步三等奖各 1 项。

the balance of lipid transport in monocytes will be impaired and lead to accumulation of a large amount of cholesterol in the cells, and subsequently lead to foam cell formation. Estradiol might inhibit LFA- 1 expression stimulated by MCP- 1, but doesn't have obvious effect on SR expression. It suggests that MCP- 1 may play an important role in atherogenesis.

巨噬细胞是动脉粥样硬化斑块中的主要细胞成分之一, 其表面的清道夫受体 (scavenger receptor, SR) 介导了修饰脂蛋白胆固醇的摄取及随后胆固醇酯的积聚和泡沫细胞的形成^[1]。因此, SR 表达及活性的调控是影响动脉粥样硬化发生的重要因素。已有研究表明, 巨噬细胞集落刺激因子、成纤维细胞生长因子、表皮生长因子和肿瘤坏死因子等可促进 SR 的表达^[2,3]。单核细胞趋化蛋白- 1 (monocyte chemoattractant protein- 1, MCP- 1) 是趋化和激活单核细胞的重要细胞因子, 它在动脉粥样硬化的局部表达明显增加^[4], 但 MCP- 1 对 SR 表达的影响尚不清楚。另外, 巨噬细胞还可分泌载脂蛋白 E, 使细胞内胆固醇外运。本文研究了 MCP- 1 对人单核细胞株 THP- 1 细胞 SR、载脂蛋白 E 及淋巴细胞功能相关抗原- 1 (lymphocyte function associated antigen- 1, LFA- 1) 表达的影响, 以进一步了解 MCP- 1 在动脉粥样硬化发生中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

THP- 1 细胞由中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库提供。重组人 MCP- 1 (美国 R&D 公司); 17- β - 雌二醇 (17- β - estradiol, E2, Sigma 公司); 小鼠抗人 LFA- 1 单克隆抗体 (丹麦 DAKO 公司); 大鼠抗小鼠 SR (SR iv 和 SR \oplus) 单克隆抗体 (2F8, 英国 Serotec 公司); 异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (中山公司)。AMV 逆转录酶、随机引物 (德国 Boehringer 公司); Taq DNA 聚合酶 (加拿大 Sangon 公司); 逆转录- 多聚酶链反应的其它试剂及总 RNA 提取试剂盒均为美国 Promega 公司产品。人 SR、载脂蛋白 E 和 β - 肌动蛋白 (β - actin, 作为内参) 的引物均由上海中国科学院细胞研究所合成, 引物序列如下: β - actin (367 bp)^[5] 上游 5' - ACACTGTGCCCATCTACGAGGGG - 3', 下游 5' - ATGATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTGGAT - 3'; SR iv (447bp) 和 SR \oplus (291 bp)^[6] 上游共同引物 5' - TGGGAACATTCTCAGACCTTGAG - 3', SR iv 下游 5' - TTGTCCAAAGTGAGCTGCCITGT - 3', SR \oplus 下游 5' - TGCCCTAATATGATCAGTGAGITG - 3'; 载脂蛋白 E (177 bp)^[7] 上游 5' - GCGGACATGGAGGACGTG - 3', 下游 5' - GGCCTGGTACACTGCCAG - 3'。

1.2 THP- 1 细胞培养

所用培养基为含 10% 小牛血清的无酚红 RPMI 1640 完全培养基 (含 L- 谷氨酰胺 2 mmol/L、Hepes 10 mmol/L 和青霉素、链霉素各 1.0×10^5 u/L), 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养。实验均采用复苏后传至第 5 代以上的细胞。

1.3 淋巴细胞功能相关抗原- 1 和清道夫受体蛋白表达的检测

THP- 1 细胞以 1×10^9 /L 接种于 24 孔板中 (1 mL/孔), 分为: 对照组 (不加 MCP- 1); ④MCP- 1 组 (加入重组人 MCP- 1, 终浓度为 100 μg /L); ④MCP- 1 + 雌二醇组 (较 MCP- 1 提前 24 h 加入 10^{-6} mol/L 的 17- β - 雌二醇)。MCP- 1 作用时间为 48 h。LFA- 1 采用流式细胞术间接免疫荧光法检测, 取约 5×10^5 个细胞, 用冷 PBA (10 mmol/L PBS, 含 0.1% BSA 和 0.1% Na_3N , pH7.4) 清洗两遍, 弃上清, 加入以 PBA 1:100 稀释的单克隆抗体 100 μL (背景对照组只加不含单抗的 PBA), 轻轻吹打混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min, PBA 洗 2 次, 再加入以 1:15 稀释的 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 抗体 100 μL , 轻轻吹打混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 30 min, 离心, 弃上清, 用冷 PBA 洗 3 次, 最后用 0.5 mL PBS 悬起细胞, 用 FACStar- PLUS 流式细胞仪检测, 以背景对照为基础计算阳性细胞率 (%) 和平均荧光强度 (MFI)。每次实验每组设 2 个复孔, 重复 3 次。

清道夫受体蛋白表达采用间接免疫荧光法检测, 置 TCS- NT 165211 型激光共聚焦扫描显微镜 (Leica 公司) 下观察、分析。激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm。每次实验每组设 2 个复孔, 实验重复 3 次, 每组随机选取 60 个细胞, 测量其平均荧光强度 (面积法)。标本净荧光强度 (NFI) = 实测平均荧光强度 - 背景组平均荧光强度。

1.4 逆转录- 多聚酶链反应检测清道夫受体和载脂蛋白 E mRNA 水平

1.4.1 总 RNA 的制备 按 Promega 公司总 RNA 提取试剂盒的操作说明书进行, 采用异硫氰酸胍/酚/氯仿法提取细胞总 RNA, 甲醛变性电泳鉴定纯度, 紫外分光光度计测定总 RNA 浓度, 重复测定 3 次, 吸光度值 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8~2.0 之间, 计算总 RNA 浓度。

1.4.2 逆转录 取 5 μg 总 RNA (约 5 μL), 依次

加入 3.2 g/L 随机引物 1 μ L, 5 \times buffer 4 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, 15 ku/L 逆转录酶 1 μ L, 40 ku/L RNasin 0.5 μ L, 加入 DEPC 处理水使总体积达 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 95 $^{\circ}$ C 灭活 10 min。

1.4.3 多聚酶链反应 逆转录产物 1 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, 载脂蛋白 E 和 β -actin 的上游引物和下游引物均为 1 μ L (20 μ mol/L), 10 \times buffer 5 μ L, 25 mmol/L 氯化镁 4 μ L, Taq 酶 (5MIU/L) 1 μ L, 加 DEPC 处理水至 50 μ L, 上铺 40 μ L 石蜡油, 变性 94 $^{\circ}$ C 1 min, 退火 55 $^{\circ}$ C 1 min, 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 30 次, 首次变性 95 $^{\circ}$ C 5 min。SR iv 和 SR ㊟ 的多聚酶链反应分开进行, 反应体系及条件除引物为 1 μ L (40 μ mol/L) 和退火温度为 58 $^{\circ}$ C 外, 其余和上述一致。

1.4.4 电泳 取 10 μ L 多聚酶链反应产物, 以 2% 琼脂糖凝胶 (含 0.5 mg/L 溴化乙锭) 进行电泳分析, 以 PCR Marker 和 λ DNA/EcoRI/Hind ㊟ Marker 为分子量标准, 电泳缓冲液为 1 \times TBE, 电泳结束后立即在紫外灯下照相, 薄层扫描仪定量底片上各带的光密度, 用其与各自内参 (β -actin) 带的比值反映其 mRNA 水平。实验重复 3 次。

1.5 统计学处理

数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 差异显著性以 t 检验判定。

2 结果

2.1 单核细胞趋化蛋白-1 对 THP-1 细胞淋巴细胞功能相关抗原-1 表达的影响

单核细胞趋化蛋白-1 组 LFA-1 的表达较对照组明显增加, 阳性细胞率分别为 66.1% \pm 2.5% 和 43.3% \pm 3.7% ($P < 0.01$), 平均荧光强度分别为 221.3 \pm 17.8 和 132.8 \pm 18.7 ($P < 0.01$)。MCP-1 + 雌二醇组的阳性细胞率和平均荧光强度分别为 59.5% \pm 2.1% 和 204.2% \pm 22.5%, 均显著低于 MCP-1 组 ($P < 0.05$)。

2.2 单核细胞趋化蛋白-1 对 THP-1 细胞清道夫受体蛋白表达的影响

在激光共聚焦扫描显微镜下可以看到, SR 主要位于 THP-1 细胞膜表面。MCP-1 组 SR 的表达较对照组明显增加, 净荧光强度值分别为 48.9 \pm 9.8 和 32.5 \pm 3.2 ($P < 0.01$)。MCP-1 + 雌二醇组的净荧光强度值为 49.7 \pm 10.4, 与 MCP-1 组无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.3 单核细胞趋化蛋白-1 对 THP-1 细胞清道夫受体和载脂蛋白 E mRNA 表达的影响

从表 1 (Table 1) 和图 1、2 (Figure 1, 2) 可以看出, MCP-1 可明显促进 THP-1 细胞 SR mRNA 的表达, 未经刺激的 THP-1 细胞仅有极少的 SR iv 表达, SR ㊟ 的表达也较低; 经 MCP-1 (100 μ g/L) 刺激 48 h 后, SR iv 和 SR ㊟ 的表达均明显增加; 而 MCP-1 对载脂蛋白 E 的表达无明显影响。

表 1 THP-1 细胞清道夫受体和载脂蛋白 E mRNA 的相对表达水平 ($n = 3$)

Table 1 Scavenger receptor and apolipoprotein E mRNA relative expression on THP-1 cells ($n = 3$)

Groups		SR iv/ β	SR ㊟ / β	apoE/ β
Control	1	0.049	0.251	0.316
	2	0.045	0.245	0.331
	3	0.052	0.248	0.319
MCP-1	1	0.248	0.687	0.321
	2	0.251	0.679	0.329
	3	0.255	0.713	0.332

β : β -actin

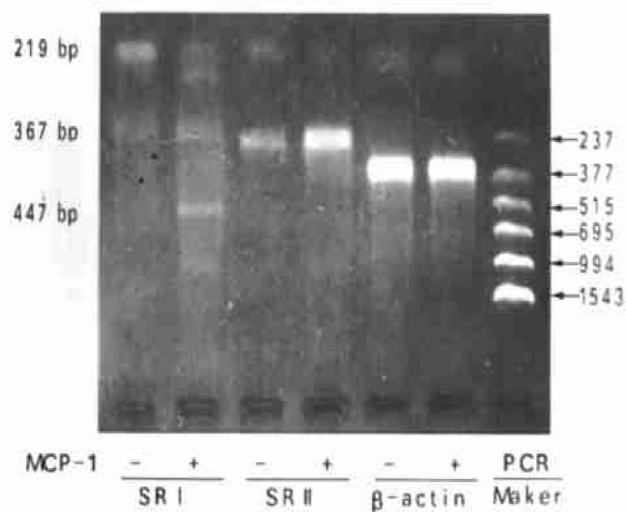


图 1 清道夫受体表达的逆转录-多聚酶链反应检测结果。

单核细胞趋化蛋白-1 可促进 THP-1 细胞清道夫受体 iv 和 ㊟ 的表达 (作用时间为 48 h)

Figure 1 The expression of scavenger receptor assayed by RT-PCR. MCP-1 increases the expression of SR iv and SR ㊟ . THP-1 cells were incubated with MCP-1 for 48 h

3 讨论

单核细胞趋化蛋白-1 具有趋化单核细胞的作用, 血管内皮细胞和平滑肌细胞等在受到刺激因素 (如氧化型脂蛋白等) 的作用时 MCP-1 的表达量可明显增加^[8]。单核细胞粘附于血管内皮细胞并迁入

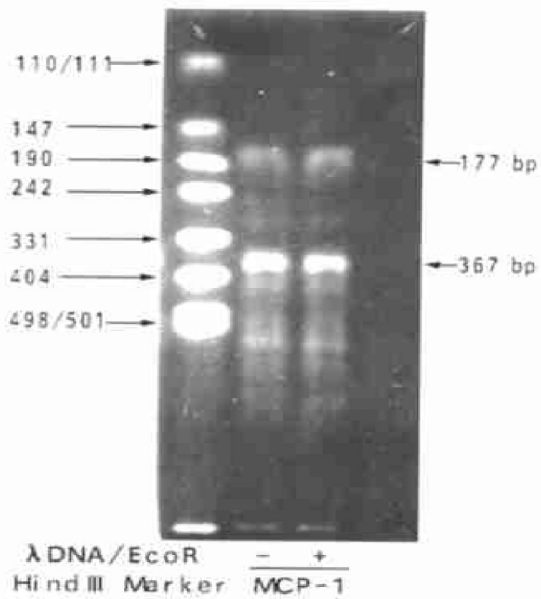


图2 载脂蛋白 E 表达的逆转录-多聚酶链反应检测结果。

单核细胞趋化蛋白-1 对 THP-1 细胞载脂蛋白 E 的表达无明显影响(作用时间为 48 h)

Figure 2 The expression of apoE assayed by RT-PCR.

MCP-1 doesn't affect apoE mRNA expression obviously. THP-1 cells were incubated with MCP-1 for 48 h

内皮摄取脂质转化为泡沫细胞是动脉粥样硬化形成的早期事件。LFA-1 是单核细胞表面的主要粘附分子,在单核-内皮细胞的粘附中发挥重要作用,本研究提示,MCP-1 还可能通过促进单核细胞表面 LFA-1 的表达而促进单核-内皮细胞粘附。

清道夫受体是一种跨膜糖蛋白,分为 I、II 两型,II 型较 I 型短,它们由同一基因编码,经多样性剪接而成^[6]。SR 基因的 5' 端没有发现类似 LDL 受体基因的胆固醇反应性成分,因此它不像 LDL 受体那样因细胞内游离胆固醇水平升高而下调,从而在泡沫细胞的形成中发挥重要作用^[9]。而载脂蛋白 E 在体内促进残体脂蛋白在肝脏摄取,组织中的巨噬细胞分泌的载脂蛋白 E 参与了胆固醇的逆转运,它可把组织中蓄积的胆固醇转运到肝脏中去降解,这是通过载脂蛋白 E 与 LDL 受体和 LDL 受体相关蛋白的高亲和性作用而实现的^[10]。

本研究显示,MCP-1 在诱导 SR mRNA 表达的同时,并不增加载脂蛋白 E mRNA 的表达,破坏了正常细胞内脂质转运的平衡,从而促进胆固醇在细胞内的大量积聚而向泡沫细胞演变。另外,巨噬细胞可通过 SR 与糖基化的 α 型胶原发生粘附,SR 中与粘附功能有关的结构为胶原样区,这一粘附功能不依赖钙离子浓度,但可被 SR 的配体所抑制^[11],因此,MCP-1 还可能通过促进巨噬细胞表面 SR 的表

达而促进巨噬细胞与内皮下基质的粘附,使巨噬细胞难于返回循环血中。最近有研究显示,17- β -雌二醇可抑制巨噬细胞对乙酰化 LDL 的摄取和代谢,从而减少胞内胆固醇的积聚和酯化,但雌二醇并不能使 SR 的数量减少,而是降低 SR 的亲合力^[12]。本研究亦显示,雌二醇对 MCP-1 诱导的 THP-1 细胞 SR 蛋白的表达无影响,但它可部分抑制 MCP-1 对单核细胞 LFA-1 表达的促进作用,这可能是其抗动脉粥样硬化机理之一。

总之,MCP-1 在动脉粥样硬化的发生中具有十分重要的作用,预防各种促进 MCP-1 表达的因素或阻断 MCP-1 的作用可能是动脉粥样硬化预防中的一个重要环节,值得深入研究。

参考文献

- [1] Thiery J, Teupser D, Walli AK, et al. Study of causes underlying the low atherosclerotic response to dietary hypercholesterolemia in a selected strain of rabbits [J]. *Atherosclerosis*, 1996, **121**(1): 63-73
- [2] 陈兵,范乐明,蔡海江,等. 巨噬细胞集落刺激因子对小鼠腹腔巨噬细胞清道夫受体途径和细胞内胆固醇酯积聚的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 1997, **5**(1): 10-14
- [3] 单志茵,楼定安,张骅,等. 两种细胞因子和表皮生长因子、纤维母细胞生长因子对血管平滑肌细胞清道夫受体活性的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6**(1): 15-17
- [4] Wilcox JN, Nelken NA, Coughlin SR, et al. Local expression of inflammatory cytokines in human atherosclerotic plaques [J]. *J Atheroscler Thromb*, 1994, **1**(Suppl 1): S10-13
- [5] Dakhama A, Macek V, Hogg JC, et al. Amplification of human beta-actin gene by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction: implications for assessment of RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded material [J]. *J Histochem Cytochem*, 1996, **44**(10): 1205-207
- [6] Geng Y, Kodama T, Hansson GK. Differential expression of scavenger receptor isoforms during monocyte-macrophage differentiation and foam cell formation [J]. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14**(5): 798-806
- [7] Locke PA, Conneally PM, Tanzi RE, et al. Apolipoprotein E4 allele and Alzheimer disease: examination of allelic association and effect on age at onset in both early- and late-onset cases [J]. *Genet Epidemiol*, 1995, **12**(1): 83-92
- [8] 于光耀,邓仲端,瞿智玲. 氧化型脂蛋白诱导血管平滑肌细胞表达单核细胞趋化蛋白-1 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6**(4): 301-304
- [9] Emi M, Asaoka H, Matsumoto A, et al. Structure, organization, and chromosomal mapping of the human macrophage scavenger receptor gene [J]. *J Biol Chem*, 1993, **268**: 120-125
- [10] 陈琪. 脂蛋白代谢(蔡海江主编). *动脉粥样硬化基础与临床* [M]. 南京:江苏科学技术出版社,1996: 54-55
- [11] Khoury J, Thomas CA, Loike JD, et al. Macrophages adhere to glucose-modified basement membrane collagen IV via their scav-

- enger receptors [J]. *J Biol Chem*, 1994, **269**(14): 10 197– 200
- [12] Sulistiyani St, Clair RW. Effect of 17 beta – estradiol on metabolism of acetylated low – density lipoprotein by THP – 1 macrophages in culture [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997,

17(9): 1 691– 700

(此文 2000– 02– 18 收到, 2000– 07– 26 修回)

(此文编辑 朱雯霞)