

## • 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2006)14-04-0286-03

## 组织因子对人脐静脉内皮细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$ 的影响

沈 琴, 朱铁兵, 杨志健, 潘金顺, 曹克将, 马文珠

(南京医科大学附属第一医院心内科, 江苏省南京市 210029)

[关键词] 细胞生物学; 组织因子对动脉粥样硬化的影响; 酶联免疫吸附测定法; 逆转录聚合酶链反应; 组织因子; 巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$ ; 人脐静脉内皮细胞

[摘要] 目的 探讨组织因子能否诱导人脐静脉内皮细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$ , 以阐明其在动脉粥样硬化发生中的作用。方法 体外培养人脐静脉内皮细胞, 分组加入不同浓度的组织因子, 采用酶联免疫吸附测定法巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  蛋白的表达, 用逆转录聚合酶链反应检测巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  mRNA 的表达, 并用单核细胞粘附率试验检测单核细胞粘附。结果 组织因子呈剂量依赖性增加内皮细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  蛋白, 0.01、0.10、1.00 及 10.00 nmol/L 组织因子分别使巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  表达明显增加 127%  $\pm$  14%、151%  $\pm$  11%、196%  $\pm$  13% 及 267%  $\pm$  43%。同时观察到组织因子促使单核细胞粘附率增加, 并且粘附率与加入的组织因子浓度呈正相关。逆转录聚合酶链反应发现组织因子能促使巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  mRNA 表达明显增加。结论 组织因子能诱导内皮细胞表达巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  增强, 这可能与组织因子致动脉粥样硬化作用机制有关。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

### Tissue Factor Enhanced the Expression of Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$ in Cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cell

SHEN Qin, ZHU Tie Bing, YANG Zhi Jian, PAN Jin Shun, CAO Ke Jiang, and MA Wen Zhu

(The Cardiology Department of the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

[KEY WORDS] Tissue Factor; Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$ ; Human Umbilical Vein Endothelial Cell; Atherosclerosis; Monocyte Adhesion; Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of tissue factor (TF) on the expression of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  in cultured human umbilical endothelial cell (hUVEC). **Methods** Different concentrations of tissue factor were incubated with hUVEC. Cell enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expression of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ . Monocyte adhesion assay was used to detect the monocyte adhesion. Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  mRNA expression were determined by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Tissue factor dramatically enhanced the levels of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  in a dose dependent manner, increasing macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  protein expression in hUVEC by 127%  $\pm$  14% at 0.01 nmol/L, 151%  $\pm$  11% at 0.10 nmol/L, 196%  $\pm$  13% at 1.00 nmol/L and 267%  $\pm$  43% at 10.00 nmol/L. In addition, 10.00 nmol/L of TF for 2 hours could significantly increase the amount of monocyte adherence to endothelial cell. Moreover, RT-PCR analysis demonstrated that the amount of macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  mRNA was increased after treatment with TF for 24 hours. **Conclusion** Tissue factor can induce macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  expression in hUVEC, which may thereby influence the pathogenesis of atherosclerosis.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生最早期的显著标志是循环中的单核细胞粘附于内皮细胞, 而巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$ (macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ )是一种主要对巨噬细胞和 T 淋巴细

胞具有趋化作用的趋化因子<sup>[1]</sup>。组织因子在 As 的发病过程中可能发挥重要的作用, 但其作用机制尚不明确。本研究旨在探讨组织因子对人脐静脉内皮细胞巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  表达的影响, 进一步了解其参与 As 的早期发病机制。

[收稿日期] 2005-05-08 [修回日期] 2006-03-13

[基金项目] 江苏省教育厅自然科学基金资助项目(JB32006)

[作者简介] 沈 琴, 硕士, 研究方向为心血管内科, E-mail 为 shenqin@zhangchanghong.cn 或 echo\_yaya@hotmail.com。朱铁兵, 博士, 主任医师, 副教授, 研究方向为脂质与冠心病, 联系电话为 02583718336-6819, E-mail 为 zhutiebings@vip.sina.com。杨志健, 博士, 主任医师, 教授, 研究方向为干细胞治疗缺血性心脏病, 联系电话为 02583718336-6819, E-mail 为 derek6585@sina.com。

## 1 材料和方法

### 1.1 人脐静脉内皮细胞的培养与处理

人脐静脉内皮细胞系(V-304, 武汉大学中国典型物保藏中心提供), 10% 小牛血清 DMEM 培养基

(Gibco) 培养, 0.1% 胰蛋白酶消化传代, Ecs 胞质出现亮绿荧光, 待细胞生长至汇合状态时随机分成实验组与对照组, 实验组加入终浓度为 0.01、0.10、1.00 及 10.00 nmol/L 的组织因子作用 24 h。空白对照组不加任何刺激因素。

## 1.2 酶联免疫吸附法测定巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$ 蛋白的表达

参考 Pigott 等<sup>[2]</sup> 方法并加以改良。培养皿弃液、固定、清洗, 小牛血清阻断 2 h 后, 加入鼠抗人巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  抗体(SZ-51, 苏州医学院血栓与止血实验室), 37℃作用 2 h, 清洗 4~6 次后加入辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG(Sigma)。加入过氧化物酶底物邻苯二胺, 显色后加 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应。用 Bio-Rad 450 酶标仪测量 492 nm 波长时的光吸收值, 将在不加任何处理因素的细胞培养孔中所测得的 OD 值定义为 100%, 加入处理因素的各孔所测得的 OD 值记录为增加的百分率。

## 1.3 单核细胞趋化试验

按 Fogelman 等<sup>[3]</sup> 方法分离人外周血单核细胞, 汇合的内皮细胞分别加入浓度为 0.01、0.10、1.00 及 10.00 nmol/L 的组织因子作用 2 h 后弃液, 清洗后按每孔 10<sup>5</sup>/L 加入单核细胞, 37℃振荡培养 25 min, 含 Ca<sup>2+</sup> 和 Mg<sup>2+</sup> 冷 PBS 清洗, 以除去未粘附的单核细胞。以空白对照组单核细胞粘附率作为 100%。

## 1.4 逆转录聚合酶链反应测定巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$ mRNA 的表达

按 1.1 所述处理细胞后, 用一步法提取各组细胞总 RNA, 用分光光度计测 A260 和 A280, 比值 > 1.8。逆转录反应: 于 DEPC 水处理的 500  $\mu$ L Eppendorf 管中加入总 RNA 10  $\mu$ L, 随机引物 Oligo(dT) 3  $\mu$ L 稍离心混匀, 70℃孵育 5 min。立即冰水浴, 再加入 MMLV 2  $\mu$ L, 逆转录反应体系 8.5  $\mu$ L, 补 Rnase 水至 30  $\mu$ L。快速离心混匀, 37℃孵育 1 h, 95℃孵育 10 min, 4℃保温。聚合酶链反应: 于 200  $\mu$ L Eppendorf 管中加入上述产物 2  $\mu$ L, 上下游引物各 1  $\mu$ L, 聚合酶链反应体系 4.5  $\mu$ L, Taq 酶 0.1  $\mu$ L, 补去离子水至 20  $\mu$ L 进行 PCR 循环(94℃变性 30 s  $\rightarrow$  58℃退火 40 s  $\rightarrow$  72℃延伸 40 s, 共 30 个循环, 末次 72℃延伸 10 min)。所用 MIP-1 $\alpha$  引物序列为: 上游引物 5'-CTG CCC TTG CTG TCC TCC TCT G-3', 下游引物 5'-CTG CCG GCT TCG CTT GGT TA-3', PCR 扩增产物长度为 197 bp。分析内参  $\beta$ -actinF 引物序列为: 上游引物 5'-TAA AGA CCT CTA TGC CAA CAC AGT-3', 下游引物 5'-CAC GAT GGA GGG GCC GGA CTC ATC-3', 扩增产物长度为 241 bp。MIP-1 $\alpha$  引物由上

海博亚公司合成,  $\beta$ -actinF 引物从 cDNA 文库检索到原始序列设计, 由上海博亚公司合成。PCR Marker 由 Invitrogen 公司提供。反应后取终产物 10  $\mu$ L 在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳分析, 紫外线照像, 用 SQ9636 扫描系统及图像分析系统测出目的基因及  $\beta$ -actinF 的积分吸光度(A) 值, 并计算二者的比值, 以此比值作为各组 mRNA 的相对表达量。

## 1.5 统计学处理

多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验, 结果以与对照组比较的百分率表示,  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度组织因子对巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$ 蛋白表达的影响

空白对照组表达不明显为 100%, 0.01、0.10、1.00 及 10.00 nmol/L 组织因子分别使巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  表达增加, 其中 0.10、1.00 及 10.00 nmol/L 时巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  的表达与对照组比较差异有显著性( $P < 0.05$ ) (表 1)。

表 1. 不同浓度组织因子对巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  蛋白表达和单核细胞粘附率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	组织因子	MIP-1 $\alpha$ 蛋白表达率	单核细胞粘附率
对照组	0 nmol/L	100%	100%
实验组	0.01 nmol/L	127% $\pm$ 14%	105% $\pm$ 7% <sup>a</sup>
	0.10 nmol/L	151% $\pm$ 11% <sup>a</sup>	112% $\pm$ 6% <sup>a</sup>
	1.00 nmol/L	196% $\pm$ 13% <sup>a</sup>	118% $\pm$ 3% <sup>a</sup>
	10.00 nmol/L	267% $\pm$ 43% <sup>a</sup>	126% $\pm$ 10% <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与对照组比较。

### 2.2 不同浓度组织因子对单核细胞粘附的影响

以空白对照组单核细胞粘附为 100%, 加入浓度分别为 0.01、0.10、1.00 及 10.00 nmol/L 时, 各组单核细胞粘附率与对照组比较差异均有显著性( $P < 0.05$ ) (表 1)。

### 2.3 组织因子对巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$ mRNA 表达的影响

当内皮细胞暴露于 0.01、0.10、1.00 及 10.00 nmol/L 的组织因子 24 h 后, 巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  mRNA 的表达明显增加(图 1), 0.01、0.10、1.00 和 10.00 nmol/L 组织因子作用时光密度比值分别为 0.30、0.47、0.62 和 0.94, 分别为对照组(0.26)的 1.18、1.86、2.42 及 3.67 倍。

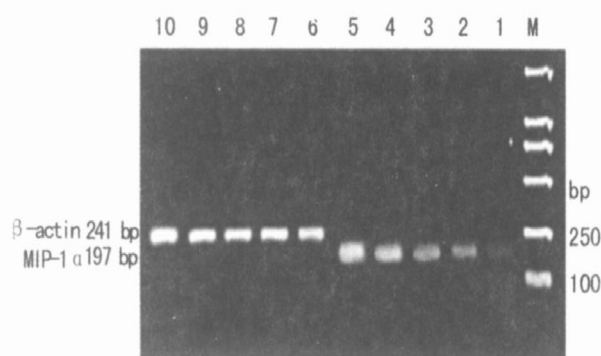


图 1. 巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  mRNA 的聚合酶链反应产物电泳结果 M 为 DNA 分子量标准; 1 和 6 为空白对照组; 2~5 分别为 0.01、0.10、1.00 和 10.00 nmol/L 组织因子组。

### 3 讨论

组织因子是凝血因子Ⅲ的细胞膜表面受体,具有启动凝血的作用。近来发现其参与动脉粥样硬化的发生与发展,但其致动脉粥样硬化的机制尚不明确<sup>[4]</sup>。Hatakeyama 等<sup>[5]</sup>取尸检病例的主动脉组织进行组织因子定位和活性测定,发现组织因子不仅存在于斑块中,还存在于细胞基质及细胞内膜,同时观测到在脂肪条纹的早期阶段,内膜的平滑肌细胞和巨噬细胞均可以检测到组织因子的表达。因此推测组织因子可能具有强烈的致动脉粥样硬化作用,实验发现其具有促使平滑肌细胞迁移增殖的作用<sup>[6]</sup>,是否还具有其他致动脉硬化作用机制值得研究。

业已证实动脉粥样硬化发生最早期的显著标志是循环中的单核细胞和 T 淋巴细胞迁入内皮下间隙,继而中膜平滑肌细胞迁入内膜并增殖,而巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  是一种主要对巨噬细胞和 T 淋巴细胞具有早期表达于内皮细胞上并介导单核粘附的主要分子。大量实验已证实巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  的表达在 As 与炎症反应中起着重要作用。敲除鼠单核细胞趋化因子 1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) 或其受体的基因产生 MCP-1 不能表达的高脂血症鼠模型,发现即使该鼠的动脉硬化病灶减少,但其动脉仍有单核巨噬细胞的浸润及泡沫细胞的形成,说明在单核细胞迁入内皮下间隙过程中,除 MCP-1 外还有其他趋化因子的参与。MIP-1 $\alpha$  与

MCP-1 同属于 CC 型趋化因子,其趋化作用的靶细胞是 T 淋巴细胞和单核/巨噬细胞,亦参与单核细胞的募集及泡沫细胞的形成<sup>[7]</sup>。Hayes 等<sup>[8]</sup>证实 As 病灶内有 MIP-1 $\alpha$  mRNA 的表达。

本研究证实组织因子在较低浓度时就能增加内皮细胞巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  的表达,并且其作用呈剂量依赖性。更重要的是,本研究发现组织因子能剂量依赖性地促使单核细胞粘附率增加,进一步证实组织因子所诱导表达的巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  具有粘附分子的功能。这些结果提示组织因子不仅可通过增强巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  的表达调节单核细胞与内皮细胞之间的粘附,而且能通过巨噬细胞炎性蛋白 1 $\alpha$  的作用增强反应部位的炎症发生。不同的斑块其形成血栓的能力不同,而脂质核越丰富的斑块,其组织因子的含量越丰富。因此,本研究结果可以认为组织因子不仅参与动脉粥样硬化的发生与发展,亦可能促进斑块炎症反应及斑块局部的血栓形成,具体组织因子为何及如何使 MIP-1 $\alpha$  表达增加,目前国内外文献报道较少,也是我们下一步需要积极研究的内容。

### [参考文献]

- [1] Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14** (5): 840-856
- [2] Pigott R, Needham LA, Edwards RM, Walker C, Power C. Structural and functional studies of the endothelial activation antigen endothelial leukocyte adhesion molecule-1 using a panel of monoclonal antibodies[J]. *J Immunol*, 1991, **147** (1): 130-135
- [3] Fogelman AM, Elahi F, Sykes K, VanLenten BJ, Territo MC, Berliner JA. Modification of the Recalde method for the isolation of human monocytes[J]. *J Lipid Res*, 1988, **29** (9): 1243-247
- [4] Grybauskas P. Role of tissue factor in atherothrombosis[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2003, **39** (12): 1165-170
- [5] Hatakeyama K, Asada Y, Marutsuka K, Sato Y, Kamikubo Y, Sumiyoshi A. Localization and activity of tissue factor in human aortic atherosclerotic lesions[J]. *Atherosclerosis*, 1997, **133** (2): 213-219
- [6] Sato Y, Asada Y, Marutsuka K, Hatakeyama K, Sumiyoshi A. Tissue factor induces migration of cultured aortic smooth muscle cell[J]. *Thromb Haemost*, 1996, **75** (3): 389-392
- [7] Gosling J, Slaymaker S, Gu L, Tseng S, Zlot LH, Young SG, et al. MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B[J]. *J Clin Invest*, 1999, **103** (6): 773-778
- [8] Hayes IM, Jordan NJ, Towers S, Smith G, Paterson JR, Eamshaw JJ, et al. Human vascular smooth muscle cell express receptor for CC chemokines[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18**: 397-403

(此文编辑 朱雯霞)