

## 稳定表达基质细胞衍生因子 1 $\alpha$ 的内皮细胞系构建及其与单核细胞的粘附作用

吴孟津<sup>1</sup>, 王佐<sup>2</sup>, 姚峰<sup>2</sup>, 李国华<sup>2</sup>, 危当恒<sup>2</sup>, 唐朝克<sup>2</sup>, 姜志胜<sup>2</sup>

(南华大学 1. 法医学教研室, 2. 心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 基质细胞衍生因子; 粘附; 单核细胞; 细胞计数; 人脐静脉内皮细胞

[摘要] 目的 构建稳定表达基质细胞衍生因子 1 $\alpha$  的 ECV304 细胞系, 研究基质细胞衍生因子 1 $\alpha$  在单核细胞/内皮细胞粘附中的作用。方法 将大鼠基质细胞衍生因子 1 $\alpha$  基因聚合酶链反应产物及质粒载体 pcDNA3.1 用 EcoR iv 进行酶切, 去磷酸化, 置于连接反应体系中进行连接, 将连接产物氯化钙法转化 DH5 $\alpha$  菌。氨苄青霉素筛选并扩增阳性菌落, 经酶切鉴定插入方向正确后, 再用 G418 筛选、逆转录聚合酶链反应检测基质细胞衍生因子 1 $\alpha$  浓度, 建立稳定转染 ECV304 细胞系。在 6 孔板上种植转染基质细胞衍生因子 1 $\alpha$  基因的 ECV304 细胞, 加 THP-1 细胞 37℃ 孵育 30 min, 磷酸缓冲液轻洗 3 遍, 去除未粘附细胞, 倒置显微镜下计数上、下、左、右、中 5 个视野, 取其平均值得到每个视野粘附单核细胞数。结果 经逆转录聚合酶链反应检测证实, 稳定表达基质细胞衍生因子 1 $\alpha$  的 ECV304 细胞系构建成功, 细胞计数表明, 转染 ECV304 细胞系粘附 THP-1 细胞数是转染空质粒的十几倍, CXCR4 单抗基质细胞衍生因子 1 $\alpha$  多抗均显著减少其粘附力 ( $P < 0.01$ )。结论 内源性基质细胞衍生因子 1 $\alpha$  能促进 ECV304 细胞与单核细胞的粘附。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Stable Expression Stromal Cell-Derived Factor-1 Alpha Endothelial Cells Line Establishment and it's Adhesion Activity with Monocyte

WU Meng-Jin<sup>1</sup>, WANG Zuo<sup>2</sup>, YAO Feng<sup>2</sup>, LI Guo-Hua<sup>2</sup>, WEI Dang-Heng<sup>2</sup>, TANG Chao-Ke<sup>2</sup>, and JIANG Zhi-Sheng<sup>2</sup>

(1. Department of Forensic Medicine, 2. Institute of Cardiovascular Disease of Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Stromal Cell-Derived Factor-1 Alpha; Adherence; Monocyte; Cells Number Counting; Human Umbilical Vein Endothelial Cell

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of stromal cell derived factor-1 alpha (SDF-1 $\alpha$ ) on adherence of ECV304/THP-1.

**Methods** Rat SDF-1 $\alpha$  gene and pcDNA3.1 were both cut with EcoR iv, dephosphorylated, and connected in connecting buffer. Then, the connecting product was transformed to DH5 $\alpha$  by calcium chloride, scanned by ampicillin, and cut by enzyme for the right inserting identification, and sub-selected by G418, SDF-1 $\alpha$  expression of ECV304 was measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) to get a stabilized SDF-1 $\alpha$  expressional cells line. Trans-gene ECV304 was seeded in a six-pore plate. Then, THP-1 was added and incubated for 30 minutes, washed with PBS about 3 times, to remove unattached cells. Cells number was counted under microscope from 5 visual field-up, under, left, right and center.

**Results** Stable SDF-1 $\alpha$  expression cells line was obtained which was identified by RT-PCR (about 360 bp), and the adherence ability of trans-gene ECV304 was ten times and more than control, and CXCR4 monoclonal antibody obviously inhibited this adherence ability ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion** Endogenous SDF-1 $\alpha$  improves adhesion of ECV304/THP-1.

基质细胞衍生因子 1 $\alpha$  (stromal cell derived factor 1 alpha, SDF-1 $\alpha$ ) 为趋化因子 CXC 亚家族。SDF-1 $\alpha$  具有强大的趋化功能, 可趋化单核细胞、淋巴细胞、白细胞、前体内皮细胞和平滑肌祖细胞的迁移, CXCR4 是其孤寡受体。最近发现 SDF-1 与动脉粥样硬化的发生发展密切相关<sup>[1-3]</sup>。最近发现氧化型低密度脂

蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 促进血管平滑肌细胞与单核细胞的粘附<sup>[4]</sup>、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 促进内皮细胞与单核细胞的粘附均与 SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 轴相关<sup>[5]</sup>, 但缺乏直接的证据。因此本研究拟构建稳定表达 SDF-1 $\alpha$  的 ECV304 细胞系, 研究 SDF-1 $\alpha$  与单核细胞/内皮细胞粘附的关系。

[收稿日期] 2007-06-06

[修回日期] 2007-07-02

[基金项目] 中国博士后基金(2005038472); 教育部重点科技基金项目(104158); 湖南省自然科学基金(06JJ5051)

[作者简介] 吴孟津, 硕士研究生, 讲师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制及防治; 通讯作者王佐, 博士后, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的分子靶标及筛药平台, E-mail 为 nb12@263.net。

### 1 材料和方法

#### 1.1 酶类和试剂盒

2 $\times$ Taq PCR MasterMix 为天为时代公司, EcoR iv

购自 Promega 公司, BamH iv、碱性磷酸酶 (CIAP) 和 Ligation kit 2.0 试剂盒均购自 Takara 公司, UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收纯化试剂盒、UNIQ-200 质粒大量抽提试剂盒均为上海生工产品, Trizol 为 Invitrogen 公司产品, 反转录试剂盒购自 Promega 公司, SDF-1 $\alpha$  兔抗鼠多抗与 CXCR4 羊抗鼠单抗分别购自博士德和 Santa Cruz 公司, 6 孔板购于 Corning 公司, pcDNA3.1/myc-His 载体为哺乳动物高效表达载体, 为 Invitrogen 公司产品, 还原型谷胱甘肽 G418 为 Clontech 公司产品。其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 pcDNA3.1 真核表达重组质粒的构建

将 PCR 产物及质粒载体 pcDNA3.1 用 EcoR iv 进行酶切, 酶切体系为 80 mL, 置于 37℃ 水浴过夜以完全切开, 次日用 1% 琼脂糖凝胶进行回收。然后将完全酶切的 pcDNA3.1 按碱性磷酸酶 CIAP 使用说明对载体进行去磷酸化, 再将去磷酸化的 pcDNA3.1 载体和 PCR 产物置于连接反应体系中进行连接。将上述连接产物加入 100 mL 氯化钙法制备的感受态 DH5 $\alpha$  菌进行常规转化。次日随机挑取 8 个菌落, 转入 2 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37℃ 振荡 12 h。取 2 mL 转化菌液, 按质粒提取试剂盒说明书步骤提取质粒, 紫外分光光度计定量后进行筛选和鉴定。用 EcoR iv 单酶切位点引入的重组质粒需经第二种 (组) 内切酶 BamH iv 酶切检验, 挑选出正向连接重组质粒。

### 1.3 转基因稳定表达细胞系的建立

用构建的 pcDNA3.1-SDF-1 $\alpha$  真核表达载体, 应用脂质体转染技术, 将 SDF-1 $\alpha$  基因导入人脐静脉内皮细胞株 ECV-304, 细胞转染 48 h, 首先以 350 mg/L G418 筛选转染细胞 2 周, 隔天换液, 8~10 天左右出现抗性克隆, 再以 200 mg/L G418 继续培养、筛选。20 天后挑单零点克隆扩大培养, 用 100 mg/L G418 维持选择压力, 从 24 孔板、6 孔板、25 mL 培养瓶、50 mL 培养瓶、100 mL 培养瓶中, 建成稳定转染细胞系。最后用 RT-PCR 法鉴定阳性克隆。

### 1.4 粘附实验

参考 Kim 等<sup>[6]</sup>的方法, 先将血管内皮细胞接种于 6 孔板, 待长成单层后, 移去普通 DMEM 培养液加入含有不同浓度 ox-LDL 的 DMEM 培养液, 细胞培养箱内孵育 48 h 或含有不同浓度 SDF-1 $\alpha$  的 DMEM 培养液, 细胞培养箱内孵育 30 min, 抗体封闭组于最后 30 min 加入 SDF-1 $\alpha$  或 LFA-1 抗体。然后移去培养液, 加入单核细胞 THP-1, 每孔  $4 \times 10^4$  个, 37℃ 孵育 30 min, 移去培养液, 用 PBS 轻轻洗涤 3 遍, 去除未粘附细胞, 倒置显微镜下计数每个视野粘附的单核

细胞数, 方法为每个孔计数上、下、左、右、中 5 个视野, 取其平均值得到每个视野粘附单核细胞数。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒 pcDNA3.1-基质细胞衍生因子 1 $\alpha$ 的构建酶切鉴定及 G418 筛选阳性克隆鉴定

首先用 EcoR iv 内切酶酶切, 重组质粒酶切后在约 5.4 kb、378 bp 处各见一清晰条带, 而 pcDNA3.1 空质粒对照组中仅出现约 5.4 kb 的载体条带, 说明重组质粒中已插入目的片断。再用 BamH iv 内切酶进行酶切以判断目的片断插入方向的正反, 酶切结果表明重组质粒 pcDNA3.1-SDF-1 $\alpha$  在约 5.5 kb、250 bp 处各见一清晰条带, 空质粒对照组中依然仅出现 5.4 kb 的载体条带, 说明插入方向正确。pcDNA3.1-SDF-1 $\alpha$  质粒转染的内皮细胞经 G418 筛选的阳性克隆则可以扩增到一条 360 bp 特异性泳带 (图 1)。

### 2.2 内源性基质细胞衍生因子 1 $\alpha$ 促进内皮细胞与单核细胞粘附

转染 SDF-1 $\alpha$  的 ECV304 与 THP-1 的粘附作用力明显比对照组增强 ( $P < 0.01$ ), 为对照组的 4 倍以上, 而这种粘附作用均明显受到 SDF-1 $\alpha$  抗体 (10 mg/L) 和 CXCR4 抗体的抑制 ( $P < 0.01$ , 图 2)。

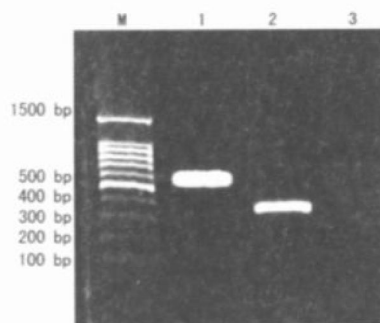


图 1 逆转录聚合酶链反应验证转基因稳定表达细胞系的建立 M 为 DNA 相对分子质量, 1 为阳性对照, 2 为转染基质细胞衍生因子 1 $\alpha$  质粒组, 3 为未转染细胞组。

## 3 讨论

基质细胞衍生因子 1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ ) 的主要活性为趋化作用, 而在众多参与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 形成的细胞中, 如炎性细胞、血小板等均表达 CXCR4 受体, 故 SDF-1 $\alpha$  可通过浓度梯度趋化这些致 As 作用的细胞进入血管病变部位, 参与 As 发病过程。特别是移植性 As 形成, SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 轴的这种作用十分明显<sup>[3]</sup>。另外, 在再狭窄内膜新生中,

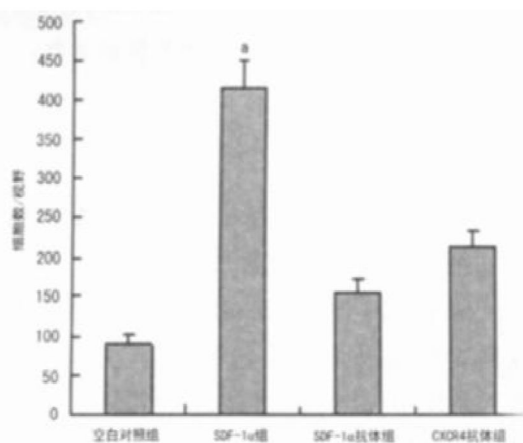


图2. 转染基质细胞衍生因子1α的内皮细胞与单核细胞的粘附作用 a为 $P < 0.01$ , 与空白对照组、SDF-1α抗体组和CXCR4抗体组比较。

SDF-1α/CXCR4轴的作用也不容忽视,当血管内皮受损后,SDF-1α在受损血管原位大量表达,特别是中层的血管平滑肌细胞,释放了大量的SDF-1α,募集血液中的炎性细胞、甚至是平滑肌祖细胞参与内膜新生<sup>[7]</sup>,用SDF-1α的抗体可以明显抑制新生内膜的形成,从另外一个方面证实了SDF-1α/CXCR4在再狭窄中的作用。

基质细胞衍生因子1α(SDF-1α)的粘附作用是我们最近发现的<sup>[5]</sup>,我们在研究中还发现,静息状态的血管内皮细胞不表达SDF-1α,但当受到ox-LDL刺激

后,SDF-1α在内皮细胞上浓度依赖性地表达。由此我们猜测SDF-1α/CXCR4很可能参与了动脉粥样硬化形成,特别是在As斑块形成的早期阶段,其可能发挥了重要作用,但目前缺乏直接的实验证据,因此,深入研究SDF-1α/CXCR4在As发生发展中的作用十分必要和迫切。

#### [参考文献]

- [1] Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, Sukhova GK, Libby P, Luster AD. The Stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques [J]. *Circ Res*, 1999, **86**: 131-138.
- [2] Andreas Schober, Sandra Knarren, Michael Lietz, Lin EA, Christian Weber. Crucial role of stromal cell-derived factor 1α in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Circulation*, 2003, **108**: 2491-497.
- [3] Hideyasu Sakihama, Taro Masunaga, Kenichiro Yamashita, Taku Hashimoto, Manabu Inobe, Satoru Todo, et al. Stromal cell derived factor-1 and CXCR4 interaction is critical for development of transplant arteriosclerosis [J]. *Circulation*, 2004, **110**: 2924-930.
- [4] 危当恒,王贵学,王佐,刘录山,吕运成,唐朝克. 基质细胞衍生因子1对低密度脂蛋白诱导单核-内皮细胞粘附的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (5): 387-390.
- [5] 王佐,吕运成,危当恒,姜志胜,李国华,姚峰,等. 基质细胞衍生因子1α对大鼠血管平滑肌细胞与单核细胞粘附的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (9): 759-762.
- [6] Kim J, Berliner J, Nadler L. AngiotensinII increase monocyte binding to endothelial cells [J]. *J Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **226** (3): 862-868.
- [7] Massberg S, Konrad I, Schürzinger K, Lorenz M, Schneider S, Zöhlhoefer D, et al. Platelets secrete stromal cell-derived factor 1α and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi in vivo [J]. *J Exp Med*, 2006, **203** (5): 1221-233.

(此文编辑 许雪梅)

#### 读者·作者·编者

### 关于汉字文稿中名词术语使用英文缩写词的规定

当一个多汉字的名词术语在汉字文稿中反复出现时,作者往往喜欢用一个英文缩写词来代替:这样做,既节省篇幅,又避免繁琐重复,为多数期刊所称颂,我刊亦不例外。然而在编辑工作中发现,由于受作者层次和参考文献种类等因素的影响,在使用名词术语的英文缩写时存在以下问题:

同一个英文名词术语,译成的汉文不同,如 derived 这个词,有的译成源性,有的译为衍化,还有的译成衍生;④缩写不规范,英文字母的大小写不一致,如载脂蛋白(apolipoprotein)缩写为 apo 已不规范,而它却有 Apo 和 apo 两种写法;④用法不当,有的用在文题中,有的用作关键词,有的名词术语仅两三个汉字,为图方便,个别作者也用缩写词来代替;而且,第一次出现时,没有汉英对照,只有缩写,这是极不应该的。有鉴于此,为求统一,我刊对汉字文稿中名词术语使用英文缩写词来代替作如下规定,请遵照执行。

1 名词术语在3个(含3个)汉字内,一律使用汉文;多于3个汉字的,才可使用英文缩写词;如胆固醇、脂蛋白、内皮素、高血压、糖尿病、再狭窄等,都只能用汉字;但冠心病、肺心病

等例外。

2 文题、摘要、关键词、正文中的各层次标题、插图和表格标题中的名词术语,不得使用英文缩写词来代替。

3 段首的名词术语需用缩写词时,为了阅读方便,可在缩写词左右加圆括号,左半圆括号之前写出汉字名词术语全称。

4 第一次使用英文缩写词来代替名词术语时,必须按照下列格式来写: 汉文全称(英文全称,缩写词)。如极低密度脂蛋白胆固醇(very low density lipoprotein cholesterol, VLDLC)、动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)等。

5 英文缩写词在汉字文稿中不用复数。

6 书写时缩写词字母之间不用连字符;若词末有数字,可在数字与左邻字母之间加连字符(用半字线),如 IL-1。

7 名词术语的英文缩写词不移行。

8 汉字文稿中不宜过多使用英文缩写词,我刊规定文献综述可用4~6个,其它文稿限4个内。

以上规定请共同遵照执行。

(胡必利起草、修订)