

基质细胞衍生因子 1 α 对氧化型低密度脂蛋白诱导内皮细胞与单核细胞粘附的影响

李国华¹, 王佐¹, 王北冰², 姜志胜¹, 吕运成³, 尹凯², 危当恒¹, 涂玉林¹
(南华大学 1. 心血管病研究所, 2. 诊断学教研室, 3. 解剖学教研室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 内皮细胞; 单核细胞; 氧化型低密度脂蛋白; 基质细胞衍生因子 1 α

[摘要] 目的 观察基质细胞衍生因子 1 α 对氧化型低密度脂蛋白诱导的单核细胞与内皮细胞粘附的影响。方法 逆转录聚合酶链反应法和免疫印迹法分别检测内皮细胞基质细胞衍生因子 1 α mRNA 和蛋白的表达, 静态粘附实验观察氧化型低密度脂蛋白和基质细胞衍生因子 1 α 抗体干预对内皮细胞与单核细胞粘附的影响。结果 基质细胞衍生因子 1 α 在静息状态下的血管内皮细胞上几乎不表达, 随着氧化型低密度脂蛋白浓度增加和处理时间延长, 基质细胞衍生因子 1 α 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显上调, 25 mg/L 氧化型低密度脂蛋白处理 48 h 时, 基质细胞衍生因子 1 α 表达达到峰值。氧化型低密度脂蛋白浓度为 1、5、25 及 125 mg/L 时, 每个视野粘附的单核细胞数分别为 190 ± 15 、 226 ± 23 、 280 ± 14 、 253 ± 8 , 而正常对照组为 104 ± 10 , 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。终浓度为 0.01、0.1 和 1 $\mu\text{g/L}$ 基质细胞衍生因子 1 α 抗体干预后, 粘附的单核细胞数分别为 202 ± 17 、 142 ± 6 和 115 ± 12 , 明显低于对照组的 279 ± 11 ($P < 0.05$)。结论 基质细胞衍生因子 1 α 参与了内皮细胞与单核细胞的粘附。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Stromal Cell-Derived Factor-1 α on Monocytes and Endothelium Cells Adhesion Induced by Oxidized Low Density Lipoprotein

LI Guo-hua¹, WANG Zuo¹, WANG Bei-Bing², JIANG Zhi-Sheng¹, LV Yun-Cheng³, YIN Kai², WEI Dang-heng¹, and TU Yu-Lin¹

(1. Institute of Cardiovascular Disease, 2. Department of Diagnostics, 3. Department of Anatomy, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Endothelium Cells; Monocytes; Oxidized Low Density Lipoprotein; Stromal Cell-Derived Factor 1 α

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the adhesion regulation effect of stromal cell-derived factor 1 α (SDF-1 α) on monocytes and endothelial cells induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL). **Methods** SDF-1 α mRNA and protein were measured by reverse transcript-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot respectively in endothelial cells. Cell counting was used to observe the effect of the monocytes and endothelial cells adhesion treated with ox-LDL or SDF-1 α antibody. **Results** SDF-1 α was hardly expressed in normal endothelium, but was up-regulated by ox-LDL in a dose and time dependent manner. It peaked at 25 mg/L ox-LDL for 48 h. The adhered amount of monocytes to endothelial cells were 190 ± 15 , 226 ± 23 , 280 ± 14 , 253 ± 8 respectively responding to 1, 5 and 125 mg/L ox-LDL. And the amount was 104 ± 10 in the control ($P < 0.05$). While endothelial cells pretreated with ox-LDL were incubated with SDF-1 α antibody with 0.01, 0.1, 1 $\mu\text{g/L}$ respectively, the adhesion of monocytes was 202 ± 17 , 142 ± 6 , 115 ± 12 . It was lower than that of control group significantly (279 ± 11 ; $P < 0.05$). **Conclusion** SDF-1 α is implicated in monocytes and endothelium cells adhesion.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种慢性炎症反应过程。单核细胞粘附于血管内皮细胞并迁入内皮下摄取脂质转化为泡沫细胞是 As 形成的早期事件。内皮功能障碍及受损是早期事件的始动环节^[1]。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)致 As 机制之一是它能激活内皮细

胞并使其产生各种粘附分子,促进内皮细胞与单核细胞粘附,促进泡沫细胞的形成^[2]。基质细胞衍生因子 1 α (stromal derived factor-1 α , SDF-1 α)是 CXC 亚家族趋化因子,近几年来 SDF-1 α 在 As 形成中的作用也开始引起重视^[3-5]。本研究进一步探讨血管内皮细胞经 ox-LDL 处理后 SDF-1 α 的表达变化及其对单核细胞与血管内皮细胞粘附的影响。

[收稿日期] 2007-06-20 [修回日期] 2007-07-01

[基金项目] 第 38 批中国博士后基金(2005038472)资助;湖南省教育厅基金(04C-581)资助;湖南省自然科学基金(06JJ50051)资助

[作者简介] 李国华, 硕士, 主要从事心血管病理生理学研究, E-mail 为 ghli20040219@163.com。通讯作者涂玉林, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事心血管病理生理学研究。王佐, 博士后, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事心血管病理生理学研究, E-mail 为 nb12@263.net。

1 材料与方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞株 ECV304 购自中国上海典型物培养中心; 人单核细胞株 THP-1 购自中国科学

院上海生物化学与细胞生物学研究所; DMEM 和 RPMI1640 培养基购自 Gibco 公司; 胎牛血清购自北京元亨圣玛生物技术研究; 新鲜冰冻血浆由购自衡阳市中心血站。Trizol 购自 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒购自 Promega 公司; $2 \times \text{Taq PCR MasterMix}$ 购自天为时代公司; 羊抗人 SDF-1 α 一抗及兔抗羊二抗购自武汉博士德公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自 Hyclone Pierce 公司; 引物由上海生物工程公司合成; 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 氧化型低密度脂蛋白的制备

按本实验室常规方法制备 ox-LDL。将 210 mL 血浆置超速离心机作序列超速离心。首先 4℃、42 kr/min 离心 18 h, 收集下层液体, 然后加入溴化钾 17.9 g 使最终密度为 1.063 g/L, 并加血浆密度标准缓冲液使总体积为 210 mL, 再置超速离心机中, 于 42 kr/min、4℃下离心 20 h, 吸出漂浮于离心管顶部橙黄色液体即得低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL)。LDL 用无乙二胺四乙酸的 PBS 液透析 72 h, 再用含 10 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 的 PBS 液于 37℃温育透析 16 h, 用含 200 $\mu\text{mol/L}$ 乙二胺四乙酸的 PBS 液室温透析 24 h, PBS 液 4℃透析 24 h。过滤除菌, BCA 法定量蛋白, 用磷酸缓冲液 (PBS) 调节蛋白浓度至 1 g/L, 4℃保存。

1.3 逆转录聚合酶链反应检测基质细胞衍生因子 1 α mRNA 的表达

将 ox-LDL 处理后的细胞, 按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA。取 2 μg 各组细胞总 RNA 逆转录合成 cDNA, 再取逆转录产物 1 μL 进行 PCR 循环。94℃温育 5 min, 94℃变性 30 s \rightarrow 52℃复性 45 s \rightarrow 72℃延伸 1 min, 共 30 个循环, 末次循环 72℃, 延伸 10 min。SDF-1 α 的引物序列: 上游 5'-TTG ACC CGA AGC TAA AGT-3', 下游 5'-CAG GGC ATG GAT GAA TAT-3', PCR 扩增产物长度为 283 bp。GAPDH 引物序列: 上游 5'-TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG-3', 下游 5'-TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG-3'。PCR 扩增产物长度为 697 bp。反应结束后, 取反应产物 5 μL 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, UVP 型凝胶图像分析系统摄影, 并分析各组目的基因及内参 GAPDH 基因灰度值, 以二者的比值代表 SDF-1 α 的相对含量。

1.4 Western blot 检测基质细胞衍生因子 1 α 蛋白的表达

在收获好的细胞中加入三去污剂裂解缓冲液裂解细胞, 于 4℃离心 10 min, 弃除沉淀, 用 BCA 法进行蛋白质定量。取 50 μg 蛋白质溶液加入 5 \times SDS

凝胶加样缓冲液中, 在 100℃加热 10 min 以使蛋白质变性。用 8% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离, 转 PVDF 膜, 丽春红染色观察转移效果, 并确定蛋白质分子量标准位置。封闭液封闭 2 h, 按 1:400 加入羊抗人 SDF-1 α , 4℃培育过夜, TBST 洗 3 次, 1:1000 加入辣根过氧化物酶标记兔抗羊二抗, 室温培育 1 h, TBST 洗 3 次, 用免疫印迹荧光检测试剂盒激发荧光, 显示于 X 光片。结果用 Labwork 凝胶图像分析系统对胶片扫描, 获取各条带的光密度值 (OD 值)。

1.5 氧化型低密度脂蛋白对血管内皮细胞与单核细胞粘附的影响

参考 Kim 等^[6]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 培养基, 加入含有不同浓度 ox-LDL 的 DMEM 培养基, 于细胞培养箱内孵育 48 h, 抗体封闭组于最后 1 h 加入 SDF-1 α 抗体。然后移去培养基, 加入 THP-1 细胞, 每孔 4×10^4 个, 37℃孵育 30 min, 移去培养基, 用 PBS 轻轻洗涤 3 遍, 去除未粘附细胞, 倒置显微镜下计数 5 个视野粘附的单核细胞数, 取平均值。

1.6 统计学处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 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 不同浓度氧化型低密度脂蛋白处理后内皮细胞基质细胞衍生因子 1 α mRNA 和蛋白的表达变化

SDF-1 α 在正常的血管内皮细胞上几乎没有表达, 当内皮细胞与不同浓度 ox-LDL 孵育 48 h 后, SDF-1 α mRNA 和蛋白表达随 ox-LDL 浓度增加逐渐增高 (1 mg/L 处理组为 0.13 ± 0.01 和 4.12 ± 0.23 , 5 mg/L 处理组为 0.53 ± 0.03 和 8.02 ± 0.16), 均明显高于对照组 ($P < 0.001$), 25 mg/L ox-LDL 处理组 (0.76 ± 0.04 , 13.78 ± 0.11) 达到峰值, 125 mg/L ox-LDL 处理组 (0.64 ± 0.01 , 9.66 ± 0.18) 反而下降 (图 1 和 2)。

2.2 氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞基质细胞衍生因子 1 α mRNA 和蛋白表达的时间效应

用 25 mg/L ox-LDL 与内皮细胞孵育 0~48 h, 6 h 后 SDF-1 α mRNA (0.22 ± 0.02) 和蛋白 (5.23 ± 0.16) 表达显著上调 ($P < 0.001$), 随着处理时间的延长, SDF-1 α mRNA 和蛋白表达逐渐增加 (12 h 为 0.49 ± 0.01 和 7.86 ± 0.27 , 24 h 为 0.62 ± 0.02 和 9.52 ± 0.13), 48 h 时 SDF-1 α mRNA (0.75 ± 0.03) 和蛋白

(13.25 ± 0.22) 的水平到达最大值(图 3 和 4)。

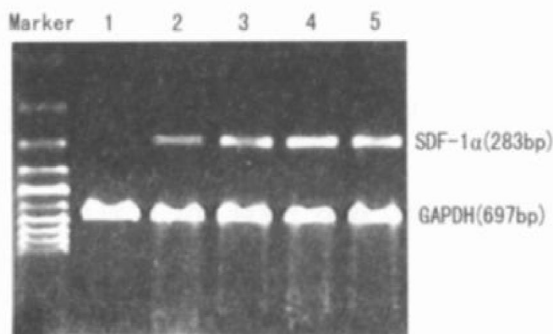


图 1. 不同浓度氧化型低密度脂蛋白处理后内皮细胞基质细胞衍生因子 1α mRNA 的表达 1 为 0 mg/L (对照组), 2 为 1 mg/L, 3 为 5 mg/L, 4 为 25 mg/L, 5 为 125 mg/L。

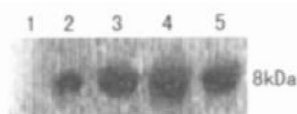


图 2. 不同浓度氧化型低密度脂蛋白处理后内皮细胞基质细胞衍生因子 1α 蛋白的表达 1 为 0 mg/L (对照组), 2 为 1 mg/L, 3 为 5 mg/L, 4 为 25 mg/L, 5 为 125 mg/L。

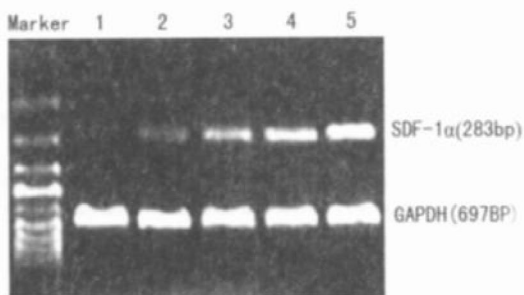


图 3. 氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞基质细胞衍生因子 1α mRNA 表达的时间效应 1 为 0 h, 2 为 6 h, 3 为 12 h, 4 为 24 h, 5 为 48 h。



图 4. 氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞基质细胞衍生因子 1α 蛋白表达的时间效应 1 为 0 h, 2 为 6 h, 3 为 12 h, 4 为 24 h, 5 为 48 h。

2.3 氧化型低密度脂蛋白对血管内皮细胞与单核细胞粘附的影响

正常的内皮细胞可以与 THP-1 单核细胞发生粘附(104 ± 10 个/视野), 但经 ox-LDL 刺激后的内皮细胞与 THP-1 单核细胞粘附作用加强, 随着 ox-LDL 浓

度的增加, 粘附的细胞数也增多。其中 1 mg/L ox-LDL 使粘附的单核细胞数明显增多(190 ± 15 个/视野); 5 mg/L ox-LDL 处理组粘附细胞数更多(226 ± 23 个/视野); 当 ox-LDL 为 25 mg/L 时, 粘附的细胞数达到最大(280 ± 14 个/视野); 当浓度为 125 mg/L 时, 粘附的细胞数反而下降(253 ± 8 个/视野; 图 5)。

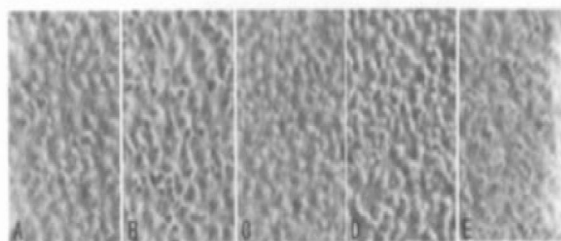


图 5. 不同浓度氧化型低密度脂蛋白对内皮细胞与单核细胞粘附的影响 A 为 0 mg/L 组, B 为 1 mg/L 组, C 为 5 mg/L 组, D 为 25 mg/L 组, E 为 125 mg/L 组。

2.4 基质细胞衍生因子 1α 抗体对血管内皮细胞与单核细胞粘附的抑制作用

加入 SDF-1α 抗体可明显抑制 THP-1 单核细胞与内皮细胞之间的粘附, 且具有浓度依赖性。0.01 μg/L 抗体组(202 ± 17 个/视野)与 ox-LDL 对照组(279 ± 11 个/视野)比较差异显著($P < 0.05$); 当抗体浓度为 0.01 μg/L 时, 这种抑制作用进一步增强(142 ± 6 个/视野), 1 μg/L 抗体组(115 ± 12 个/视野)与空白对照组(106 ± 8 个/视野)比较无明显差异。当 SDF-1α 抗体浓度达到 1 μg/L 时, 几乎完全抑制单核细胞与内皮细胞之间的粘附(图 6)。

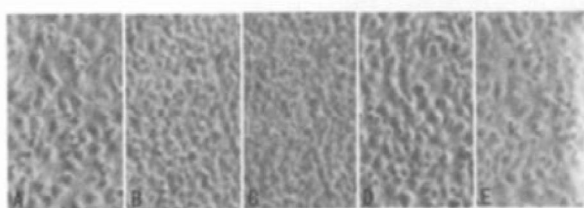


图 6. 基质细胞衍生因子 1α 抗体对氧化型低密度脂蛋白处理的内皮细胞粘附单核细胞的影响 A 为 0 mg/L ox-LDL, B 为 25 mg/L ox-LDL, C 为 25 mg/L ox-LDL + 0.01 μg/L 抗体, D 为 25 mg/L ox-LDL + 0.1 μg/L 抗体, E 为 25 mg/L ox-LDL + 1 μg/L 抗体。

3 讨论

内皮功能的完整性对维持血管正常的生理状态具有重要意义, As 就是以内皮功能障碍为起始的。内皮细胞表达粘附分子并与单核细胞发生粘附是内皮细胞功能受损而处于激活状态的表现之一, 也是 As 发生的重要步骤。ox-LDL 被公认为具有致 As 作

用,它能激活血管内皮细胞并使其表达各种粘附分子、细胞因子和趋化因子等促使单核细胞粘附于内皮细胞。本研究结果发现,正常内皮细胞能与单核细胞发生粘附,当加入 ox-LDL 培养 48 h 后,内皮细胞与单核细胞粘附的细胞数显著增加,说明 ox-LDL 促进单核细胞与内皮细胞之间的粘附。

本研究还发现, ox-LDL 能诱导内皮细胞表达 SDF-1 α 。SDF-1 α 是 CXC 亚家族趋化蛋白,其特异性受体为 CXCR4,属 G 蛋白偶联受体家族。趋化因子 SDF-1 α 及其特异受体 CXCR4 在维持胚胎发育、造血干细胞的迁移和归巢、肿瘤细胞迁移、免疫反应、炎症反应和介导人类免疫缺陷病毒(HIV)感染等方面发挥重要作用^[7]。近来研究发现 SDF-1 α 又在 As 斑块中高表达, SDF-1 α /CXCR4 与 As 的关系已经引起重视^[8]。Abi-Younes 等^[3]在人的冠状动脉粥样硬化斑块中检测到 SDF-1 α 高表达,而正常动脉壁中未见表达,并确认其主要表达在内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞。Andreas 等^[4]研究发现, SDF-1 α 表达在载脂蛋白 E^{-/-} 鼠动脉内膜损伤后形成的新生内膜中,双色荧光标记证实其主要表达在新生内膜的平滑肌细胞。Hideyasu 等^[5]在小鼠胸主动脉同种异体移植模型中发现,移植物 As 病灶中检测到 SDF-1 α 高表达。危当恒等^[9]发现 SDF-1 α 在正常的内皮细胞上几乎不表达, LDL 能诱导 SDF-1 α 的表达;王佐等^[10]检测到 ox-LDL 能使大鼠 VSMC 上 SDF-1 α 表达上调。本研究采用 RT-PCR 和 Western blot 分别检测内皮细胞上 SDF-1 α 基因转录和蛋白表达水平,发现 SDF-1 α 在静息状态下的内皮细胞上几乎不表达,随着 ox-LDL 浓度增加和处理时间的延长表达上调, 25 mg/L ox-LDL 处理 48 h 达峰值,当 ox-LDL 为 125 mg/L 时反而下降,可能是 ox-LDL 毒性作用所致。以上说明 SDF-1 α 在正常的内皮细胞上几乎不表达,在激活的内皮细胞表达; ox-LDL 可以使内皮细胞上 SDF-1 α 呈浓度和时间依赖性表达上调。

基质细胞衍生因子(SDF) 1 α 在 ox-LDL 所致的内皮细胞与单核细胞粘附密切相关。在本研究中,经 ox-LDL 处理后内皮细胞与单核细胞的粘附较对照组显著增加,用 SDF-1 α 单抗可明显抑制二者的粘附且呈浓度依赖性。危当恒等^[9]用 LDL 处理内皮细胞株 ECV304 24 h 后亦发现内皮细胞与单核细胞的粘附显著增加,且其粘附同样可以被 SDF-1 α 单抗抑制。我们以前的试验也表明,经 ox-LDL 处理后平滑肌细胞与单核细胞的粘附较对照组明显增加,用 SDF-1 α 单抗可以明显抑制二者的粘附且呈浓度依

赖性^[11]。这说明虽然有许多粘附分子参与了内皮细胞与单核细胞的粘附,但是 SDF-1 α 在 ox-LDL 所致的内皮细胞与单核细胞粘附密切相关。但在动物试验中,用抗体中和 SDF-1 α 可抑制内膜新生和肥大,但单位面积病变区内的单核细胞较对照组无差别^[4,12]。而 Ute 等^[12]等证实单位面积病变区内的 CD4⁺ T 细胞明显减少。这样 SDF-1 α 对单核细胞的作用在体内实验与体外细胞实验所获得的结果相矛盾,然而目前已有多篇文献证实单核细胞上有 SDF-1 α 受体 CXCR4 的表达,所以 SDF-1 α 在体内对单核细胞的具体作用有待进一步研究。

综上所述, ox-LDL 可以使内皮细胞上 SDF-1 α 表达上调,且具有浓度和时间依赖性,可以增加内皮细胞与单核细胞的粘附,但可以被 SDF-1 α 抗体所抑制,表明 SDF-1 α 与 ox-LDL 所致的单核细胞粘附密切相关。因此进一步研究明确 SDF-1 α 参与早期动脉硬化的发生发展,对于预防和控制动脉硬化的发生和发展将具有重要意义。

[参考文献]

- [1] Cybulsky MI, Lichtman AH, Hajra L, Iiyama K. Leukocyte adhesion molecules in atherogenesis [J]. *Clin Chim Acta*, 1999, **286** (1-2): 207-218.
- [2] Bjarne iSterud, Eirik Björklid. Role of monocytes in atherogenesis [J]. *Physiol Rev*, 2003, **83**: 1 069-112.
- [3] Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, Sukhova GK, Libby P, Luster AD, et al. The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques [J]. *Circ Res*, 1999, **86**: 131-138.
- [4] Andreas S, Sandra K, Michael L, Elisa AL, Christian W. Crucial role of stromal cell-derived factor-1 α in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein e-deficient mice [J]. *Circulation*, 2003, **108**: 2 491-497.
- [5] Hideyasu S, Taro M, Kenichiro Y, Taku H, Manabu I, Satoru T, et al. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 interaction is critical for development of transplant arteriosclerosis [J]. *Circulation*, 2004, **110**: 2 924-930.
- [6] Kim JA, Berliner JA, Nadler JL. Angiotensin II increase monocyte binding to endothelial cells [J]. *J Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **226** (3): 862-868.
- [7] 杨文博, 孔佩艳. 趋化因子基质细胞衍生因子 1 (SDF-1) 及其受体 CXCR4 [J]. *免疫学杂志*, 2003, **19** (3): 142-144.
- [8] 吕运成, 王佐. 基质细胞衍生因子 1 α 及其特异受体 CXCR4 与动脉粥样硬化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (4): 523-525.
- [9] 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.
- [10] 王佐, 童中艺, 冯飞玲, 姜志胜, 周晓峰, 宋砚明, 等. ox-LDL 对大鼠血管平滑肌细胞表达基质细胞衍生因子-1 α 的影响 [J]. *中国生物化学与生物物理学报*, 待发表.
- [11] 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 1 α 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.
- [12] Ute Z, Andreas S, Michael L, Elisa AL, Wolfgang E, Neil E, et al. Neointimal smooth muscle cells display a proinflammatory phenotype resulting in increased leukocyte recruitment mediated by p-selectin and chemokines [J]. *Circ Res*, 2004, **94**: 776-784.

(此文编辑 文玉珊)