

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2007)15-07-0494-03

重组基质细胞衍生因子 1 α 对单核细胞的趋化作用姚峰^{1,2}, 王佐², 童中艺², 危当恒², 姜志胜², 周晓峰², 田永凤², 宋砚明²

(南华大学 1. 实验动物学部, 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 1 α ; 重组质粒; 单核细胞; 基因表达; 趋化作用

[摘要] 目的 探讨 pcDNA3.1-基质细胞衍生因子 1 α 重组质粒对单核细胞的趋化作用。方法 将 pcDNA3.1-基质细胞衍生因子 1 α 质粒用脂质体的方法导入人脐静脉内皮细胞株 ECV304 细胞中, G418 筛选细胞克隆。通过逆转录聚合酶链反应法在转录水平检测基质细胞衍生因子 1 α 在转基因 ECV304 细胞中的表达。通过 Transwell 实验研究基质细胞衍生因子 1 α 对单核细胞的趋化作用。结果 获得了稳定表达基质细胞衍生因子 1 α 基因的 ECV304 细胞克隆, pcDNA3.1-基质细胞衍生因子 1 α 重组质粒对单核细胞具有趋化作用。结论 重组大鼠基质细胞衍生因子 1 α 对单核细胞具有明显的趋化作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Chemotactic Role of Recombinant pcDNA3.1-Stromal Cell Derived Factor-1 α on Mononuclear CellYAO Feng^{1,2}, WANG Zuo², TONG Zhong-Yi², WEI Dang-Heng, JIANG Zhi-Sheng, ZHOU Xiao-Feng, TIAN Yong-Feng, and SONG Yan-Ming

(1. Department of Laboratory Animal Science, 2. Institute of Cardiovascular Disease Research, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Stromal Cell Derived Factor-1 α ; Recombinant Plasmid; Mononuclear Cell; Gene Expression; Chemotactic Role

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of pcDNA3.1-SDF-1 α plasmid on THP-1 cells chemotaxis. **Methods** pcDNA3.1-SDF-1 α plasmid was transfected into ECV304 cells by lipofectamine and the positive clones were screened by G418. The expression of SDF-1 α gene in the transfected ECV304 cells were detected by RT-PCR. Then explored the effect of SDF-1 α on THP-1 cells chemotaxis with transwell permeable supports. **Results** G418-resistant ECV304 cell clones were obtained. **Conclusion** SDF-1 α recombinant protein obviously induce migration of THP-1 cells.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是由炎症细胞(如单核细胞和 T 细胞)参与的慢性进行性疾病。趋化因子通过活化和介导细胞进入动脉粥样斑块内,在动脉粥样硬化和斑块不稳定方面起重要作用。最近研究发现基质细胞衍生因子(stromal cell derived factor-1, SDF-1)对动脉粥样硬化的发生发展起重要作用^[1]。本研究拟以用脂质体的方法将 pcDNA3.1-SDF-1 α 质粒导入人脐静脉内皮细胞株 ECV304 细胞中,通过 G418 筛选出在 ECV304 细胞中可稳定表达 SDF-1 α 的细胞系,并初步探讨重组 SDF-1 α 对单核细胞的趋化作用。

1 材料与方法

1.1 质粒的提取和鉴定

pcDNA3.1-SDF-1 α 质粒构建并保存于大肠杆菌中(含 EcoRI 和 BamHI 酶切位点)^[2]。质粒用 QIA-GEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN 公司)按操作说明书抽提。常规方法进行酶切反应,于 37℃ 酶切 1 h,琼脂糖凝胶电泳检测。酶切完全后置 65℃ 水浴 15 min 终止反应。

1.2 内皮细胞的培养及分组

人脐静脉内皮细胞株 ECV304(上海典型物培养中心),人单核细胞株 THP-1(上海细胞所)均用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基(Invitrogen 公司)常规培养,第 3~5 代用于实验,实验分组:正常对照组未转染内皮细胞,抗体组 50 mg/L LDL 孵育 24 h,空质粒组转染 pcDNA3.1,重组质粒组转染 pcDNA3.1-SDF-1 α 质粒。

1.3 细胞转染及筛选用 G418 浓度

用乙醇沉淀质粒 DNA 后,再用 70% 乙醇洗涤沉

[收稿日期] 2007-06-08 [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(104158);湖南省自然科学基金(06jj5051)联合资助

[作者简介] 姚峰,硕士,研究方向为动脉粥样硬化发病机制, E-mail 为 yaofeng0629@126.com。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。

淀,去上清,把离心管敞开放于超净工作台上以让痕量的乙醇挥发,再用无菌双蒸水溶解。在 6 孔板中,每孔接种 2×10^5 个细胞于无血清培养基,次日细胞生长至 50%~70% 汇合。将 1 μ L 质粒 DNA 和 2 μ L 脂质体分别溶于 100 μ L 无血清培养基,20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C 放置 15 min。将两种溶液合并,再加 800 μ L 无血清培养基,混匀,20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C 放置 15 min。在培养细胞中加入上述质粒 DNA-脂质体混合物。37 $^{\circ}$ C 培养 24 h 后加入完全培养基继续培养 24 h,转染细胞后 48 h 使转入的基因表达并进行观察分析。用 RPMI1640 培养基配制浓度分别为 150、250、350、450 和 550 mg/L 的 G418 液,分别加入到培养 ECV304 细胞的 6 孔板中,继续培养 8~10 天,选取 ECV304 细胞全部死亡孔 G418 的最低浓度为工作浓度^[3]。

1.4 逆转录聚合酶链反应

将转染后的 ECV304 按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA。取 2 μ g 各组细胞总 RNA 逆转录合成 cDNA,再取 10 μ L 逆转录产物进行 PCR 循环。94 $^{\circ}$ C 温育 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s \rightarrow 60 $^{\circ}$ C 复性 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 30 个循环,末次循环 72 $^{\circ}$ C,延伸 10 min。SDF-1 α 引物序列:上游 5'-ATG GAC GCC AAG GTC GTC-3',下游 5'-CAG GCC CTC CTC CCC ACC-3',扩增片段长度 360 bp; β -actin 引物序列:上游 5'-AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC-3',下游 5'-CGA TAG TGA TGA CCT GAC CGT-3',扩增产物长度 560 bp。反应结束后,取反应产物 5 μ L 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色,UV 型凝胶图像分析系统摄图。以未转染基因 ECV304 细胞为阴性对照。

1.5 迁移试验

单核细胞迁移用 8 μ m 孔径的小室迁移系统来分析。THP-1 细胞均匀悬于 0.5% 胎牛血清的 RPMI1640 中,然后加到上室;在下室加入条件培养基。37 $^{\circ}$ C 孵育 10 h 后取出上室。在显微镜下(200 \times)连续计数 5 个视野的细胞数。

1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用方差分析和 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 SPSS11.5 统计软件进行统计。

2 结果

2.1 质粒的鉴定及 G418 浓度的确定

将重组质粒首先用 EcoRI 内切酶酶切,酶切后在 5.4 kb、378 bp 处各见一清晰条带,而对照组仅出现 5.4 kb 的载体条带,说明重组质粒中已插入目的

片断。再用 BamHI 内切酶进行酶切,酶切后重组质粒在 5.5 kb、250 bp 处各见一清晰条带,说明插入方向正确。将 ECV304 细胞在含不同浓度的 G418 培养基中培养 8~10 天后,当 G418 浓度 ≥ 350 mg/L 时,ECV304 细胞全部死亡;当 G418 浓度 < 350 mg/L 时,ECV304 细胞仍有不同程度的存活,因此将 G418 筛选浓度确定为 350 mg/L。

2.2 稳定转染细胞系的鉴定

细胞转染 48 h,首先以 350 mg/L G418 筛选转染细胞 2 周,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 6 孔板 \rightarrow 25 mL 培养瓶 \rightarrow 50 mL 培养瓶 \rightarrow 100 mL 培养瓶中,建成稳定转染细胞系。对照 pcDNA3.1 的转染与筛选同上。未转染的内皮细胞未扩增到基因片段。pcDNA3.1-SDF-1 α 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特异性的泳带,约 360 bp。

2.3 迁移实验

重组质粒明显促进 THP-1 细胞迁移,与对照组比较差异有显著性($P < 0.01$,图 1)。

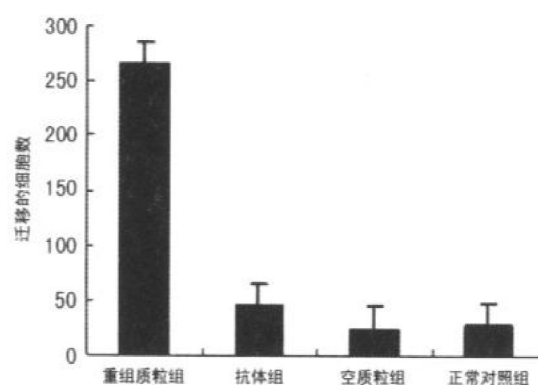


图 1. 重组基质细胞衍生因子 1 α 促进 THP-1 细胞迁移

3 讨论

研究证实 SDF-1 α 与动脉粥样硬化密切相关。Abi-Younes 等^[5]采用免疫组织化学及 Western blot 检测到 SDF-1 α 仅在斑块中高表达,而正常动脉壁中未见表达,并确认其主要在平滑肌细胞、内皮细胞等中表达。Andreas Schober 等^[6]在载脂蛋白 E^{-/-} 鼠动脉内膜损伤后恢复覆盖的过程中亦检测到 SDF-1 α 的高表达,并用双荧光染色法证实其表达的绝大部分位于平滑肌细胞上。Hideyasu 等^[7]在小鼠模型因移植排斥反应而出现的动脉粥样硬化病灶中检测到 SDF-1 α 表达上调。

基质细胞衍生因子(SDF-1 α)可能参与了炎症细胞的募集。吕运成等^[8]用 α -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 单抗可明显抑制二者的粘附且呈浓度依赖性。危当恒^[9]等用 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明显增加,且其粘附同样可被 SDF-1 α 单抗抑制。这就说明 SDF-1 α 参与了单核细胞的募集,但是还有许多粘附分子在其中的作用不可忽视。动物实验发现给 SDF-1 α 单抗的鼠模型单位面积病变区内的单核细胞较对照组无差别^[6,10],但 Ute 等^[10]证实单位面积病变区内的淋巴细胞却明显减少。因此单核细胞募集在体实验与体外细胞实验所获得的结果相矛盾,但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 在体内募集单核细胞中到底发挥多大作用有待进一步研究。

本研究将 SDF-1 α 基因转入内皮细胞株 ECV304,得到稳定转染细胞系,趋化实验表明 SDF-1 α 基因直接参与了单核细胞的趋化过程,至于在动脉粥样硬化病中的作用机制,有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] 姚峰,王佐,吴端生,等. SD 大鼠 SDF-1 α 基因真核表达载体的构建及鉴定[J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17 (6): 317-320.
- [3] 张卓然(主编). 实用细胞培养技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999, 78-85.
- [4] Libby P. Inflammation in atherosclerosis [J]. *Nature*, 2002, 420 (6917): 868-874.
- [5] 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.
- [6] Andreas Schober, Sandra Knarren, Micheal Lietz, Lin EA, Christian Weber. 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.
- [7] Hideyasu S, Taro M, Kenichiro Y. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 interaction is critical for development of transplant arteriosclerosis [J]. *Circulation*, 2004, 110: 2 924-930.
- [8] 吕运成,王佐,危当恒. α -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]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15 (1): 34-37.
- [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] Ute Z, Andreas S, Michael L. 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)

欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎引用! 欢迎刊登广告!

《中国动脉硬化杂志》

中国科技核心期刊

作为专业性极强的高级学术期刊,我刊主要报道国内外防治动脉硬化性疾病(如高脂蛋白血症、动脉粥样硬化、冠状动脉疾病、高血压、缺血性脑血管病和其它动脉硬化性疾病)中的研究论文(含流行病学研究、实验研究、临床研究和方法学研究)、诊治经验、研究综述、文献综述、病例报道、知识讲座等。其办刊宗旨是:通过报道防治动脉硬化性疾病的新理论、新观点、新疗法、新药物;介绍防治的新经验和新知识;既引导和弘扬我国的学术研究,促进国内外学术交流,将中国这一领域的研究推向世界和未来;又普及防治知识,提高全民的健康水平。我刊是科技部《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、中国科学院《中国科学引文数据库》来源期刊和《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,被美国《化学文摘(CA)》、俄罗斯《文摘杂志(AJ)》和国内全部数据库收录。据中国科技期刊引证报告,我刊 2004 年的影响因子(IF)为 0.953,位居当年全国 1 608 种统计源期刊中的第 93 位;总被引频次 689,列第 266 位,这二项指标都进入优秀期刊行列。

我刊为月刊,每月 26 日出版,A4 开本,高档双胶纸印刷。定价 11 元,全年 132 元。由湖南省报刊发行局发行,医药卫生类,邮发代号 42-165。我刊热忱欢迎海内外同仁和社会各届朋友向《中国动脉硬化杂志》投稿,到当地邮局订阅。若错过邮局征订日期,可直接写信和邮汇订购费到编辑部补办订购手续。同时欢迎并采取下述措施激励广大同仁引用:凡在《中国科技论文统计源期刊》和《中国科学引文数据库来源期刊》上发表的文章中引用了我刊的文章者,凭当期刊封面、目次页和文章的复印件可获赠第二年全年刊物一份。

主编杨永宗教授和副主编兼编辑部主任胡必利教授率全体办刊人员向长期关心、爱护和支持《中国动脉硬化杂志》的海内外同仁和社会各界朋友致以衷心的感谢!祝愿您健康长寿,万事如意!