

单核细胞趋化因子 1 和 Fractalkine 对平滑肌细胞增殖、趋化和组织因子表达的影响

黎娜^{1,2}, 朱文玲¹, 陈莲凤¹, 柯元南²

(1. 北京协和医院心内科, 北京市 100005; 2. 卫生部中日友好医院心内科, 北京市 100029)

[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉粥样硬化; 血管平滑肌细胞; 组织因子; 单核细胞趋化因子 1; Fractalkine; 细胞增殖

[摘要] 目的 观察趋化因子单核细胞趋化因子 1 和 Fractalkine 对血管平滑肌细胞组织因子表达及血管平滑肌细胞增殖和趋化的影响。方法 在细胞水平, 采用酶联免疫吸附法检测单核细胞趋化因子 1、Fractalkine 和单核细胞趋化因子 1+ Fractalkine 对组织因子抗原表达的影响, 噻唑蓝法比较单核细胞趋化因子 1、Fractalkine 和单核细胞趋化因子 1+ Fractalkine 对血管平滑肌细胞增殖的作用, 细胞趋化实验比较单核细胞趋化因子 1、Fractalkine 和单核细胞趋化因子 1+ Fractalkine 对血管平滑肌细胞趋化的影响。结果 单核细胞趋化因子 1 和 Fractalkine 可增加血管平滑肌细胞组织因子抗原的表达, 单核细胞趋化因子 1 与 Fractalkine 共同作用后, 组织因子抗原表达量较二者单独作用时明显降低。Fractalkine 对血管平滑肌细胞有明显的促增殖作用, 但单核细胞趋化因子 1+ Fractalkine 和单核细胞趋化因子 1 均无明显促增殖作用。Fractalkine 和单核细胞趋化因子 1+ Fractalkine 对血管平滑肌细胞有明显的趋化作用, 而单核细胞趋化因子 1 的趋化作用不够明显。结论 单核细胞趋化因子 1 和 Fractalkine 在动脉粥样硬化过程中分别对血管平滑肌细胞组织因子的表达、增殖和趋化发挥了不同程度的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Monocyte Chemotactic Protein-1 and Fractalkine on Tissue Factor Expression, Proliferation and Chemotaxis of Vascular Smooth Muscle Cell

LI Na^{1,2}, ZHU Wen-Ling¹, CHEN Lian-Feng¹, and KE Yuan-Nan²

(1. Department of Cardiology, Beijing Xiehe Hospital, Beijing 100005; 2. Department of Cardiology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Vascular Smooth Muscle Cell; Tissue Factor; Monocyte Chemotactic Protein-1; Fractalkine; Proliferation

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effects of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and Fractalkine on tissue factor (TF) expression, proliferation and chemotaxis of vascular smooth muscle cell (VSMC). **Methods** The effects of MCP-1, Fractalkine and MCP-1+ Fractalkine on TF antigen expression were analyzed by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Their effects on VSMC proliferation were analyzed by MTT. And their effects on VSMC chemotaxis were evaluated by cell chemotaxis experiment. **Results** MCP-1 or Fractalkine could induce TF antigen in VSMC, but was less effective by MCP-1+ Fractalkine than by MCP-1 or Fractalkine. MCP-1 and Fractalkine had competitive inhibition. Fractalkine had a strong impact on VSMC proliferation, while MCP-1+ Fractalkine or MCP-1 had not. Fractalkine and MCP-1+ Fractalkine induced the VSMC chemotaxis, while MCP-1 had little such function. **Conclusions** MCP-1 and Fractalkine had important effects on the atherosclerosis by working on TF expression, VSMC proliferation and chemotaxis.

趋化因子是一组结构和功能相似的细胞因子, 对不同细胞具有趋化效应, 它们参与炎症反应的各个阶段, 包括粘附、迁移、清除致炎症物质和修复等。单核细胞趋化因子 1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) 和其受体在动脉粥样硬化 (atherosclerosis,

As) 形成过程中, 对巨噬细胞的聚集起到重要作用。膜结合型 Fractalkine 参与炎症细胞的附壁过程, 可溶型 Fractalkine 与趋化作用有关, Fractalkine 对单核/巨噬细胞趋化作用强烈。组织因子 (tissue factor, TF) 参与了 As 病变的发生发展过程, 决定了斑块的促凝性。有研究发现 MCP-1 和 Fractalkine 在不同程度上影响 TF 的表达。血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的增生、迁移是 As 病理过程中的重要环节, 有多种炎性介质参与其中, 如能抑制这两个过程可以干预 As 的进展。但是目前 MCP-

[收稿日期] 2006-02-22 [修回日期] 2006-09-08

[作者简介] 黎娜, 博士, E-mail 为 lina24024024@sina.com。通讯作者朱文玲, 教授, 博士研究生导师, E-mail 为 zhuwenling@263.net。陈莲凤, 主管技师, 在心血管基础研究方面有广泛研究。柯元南, 教授, 博士研究生导师。

1 和 Fractalkine 对 VSMC 的作用研究不多, 本实验拟研究 MCP-1、Fractalkine 对 VSMC 中 TF 表达和 VSMC 趋化、增殖的影响, 探讨 TF 与趋化因子在 As 中的作用及相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验动物为纯系新西兰大白兔 1 只, 雄性, 体重约 2 kg。小鼠抗人 TF 单克隆抗体由复旦大学分子遗传研究室马端博士后馈赠; 小鼠抗人 α -actin (平滑肌) 单克隆抗体购自北京中山金桥生物技术有限公司; 羊抗鼠 IgG/HRP 购自北京中山金桥生物技术有限公司。恒温 CO₂ 培养箱 (REVC0); 超净工作台 (Forma Scientific); Transwell 24 孔细胞培养板 (Costar); 酶标仪 Clini Bio 128C 型 (奥地利); 细胞培养板 (Nunc) 。MCP-1、Fractalkine 购自 Abcam 公司; SM-GS 购自 Cascade Biologics 公司; 胎牛血清购自 HYCLONE 公司; DMEM 培养基购自 GIBCOBRL 公司。

1.2 兔血管平滑肌细胞培养

采用组织贴块法培养兔主动脉平滑肌细胞。将兔耳缘静脉空气栓塞法处死, 严格无菌条件下将主动脉剪断取出, 用 D-hank's 液冲洗。将主动脉外膜撕去, 沿纵轴剪开主动脉, 弯头镊轻轻刮去血管内皮。将血管中膜剪成约 1.5 mm × 1.5 mm 大小组织块, 均匀贴于培养瓶中。将培养瓶置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内, 倒置待观察到组织块已牢固贴于培养瓶后, 即加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基及少量平滑肌细胞生长添加剂, 继续置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养。组织块周围生长增殖形成单层细胞, 当达到 80% 汇合时, 即进行传代培养。取第 3~6 代细胞进行实验。使用倒置相差显微镜观察 VSMC, 行形态学鉴定, 并用 α -actin 行免疫组织化学染色鉴定。

1.3 实验药物溶液的制备

单核细胞趋化因子 1 浓缩液 100 μ g/L, 用 DMEM 稀释成 3 nmol/L 和 6 nmol/L 工作液。Fractalkine 浓缩液 100 μ g/L, 用 DMEM 稀释成 20 nmol/L 和 40 nmol/L 工作液。

1.4 细胞酶联免疫吸附试验

细胞同步化后按分组加药。对照组: DMEM 200 μ L; MCP-1 组: MCP-1 3 nmol/L 200 μ L; Fractalkine 组: Fractalkine 20 nmol/L 200 μ L; MCP-1+ Fractalkine 组: MCP-1 6 nmol/L 100 μ L+ Fractalkine 40 nmol/L 100 μ L。作用 8 h, 封闭, 依次作用于一抗工作液 TF

1: 100、1: 500 稀释的 HRP 标记羊抗小鼠二抗, 读取 A₄₉₂ (参考 620 nm)。

1.5 细胞增殖活性测定

采用 MTT 法评价细胞的增殖活性。对照组: DMEM 200 μ L (对照); MCP-1 组: MCP-1 3 nmol/L 200 μ L; Fractalkine 组: Fractalkine 20 nmol/L 200 μ L; MCP-1 + Fractalkine 组: MCP-1 6 nmol/L 100 μ L + Fractalkine 40 nmol/L 100 μ L。依次培养 24、48、72 和 96 h, 终止反应, 每孔加入 5 g/L MTT 10 μ L, 继续孵育 4 h, 吸弃上清, 加入 DMSO 150 μ L, 振荡 10 min, 测 A₅₇₀ 值。

1.6 细胞趋化实验

对照组: DMEM 0.6 mL (对照); MCP-1 组: MCP-1 3 nmol/L 0.6 mL; Fractalkine 组: Fractalkine 20 nmol/L 0.6 mL; MCP-1 + Fractalkine 组: MCP-1 6 nmol/L 0.3 mL + Fractalkine 40 nmol/L 0.3 mL。使用 24 孔 Transwell 细胞培养室, 微孔滤膜为透明聚碳酸酯膜 (PC), 孔径为 8 μ m, 孔密度为 $1 \times 10^5/\text{cm}^2$ 。将培养的 VSMC 消化、离心后, 用含 0.4% 胎牛血清 DMEM 培养基重悬浮, 浓度约为 $2.0 \times 10^8/\text{L}$ 。在 Transwell 细胞培养室下室按分组加入工作液, 上室加入细胞悬液 0.1 mL (约 20 000 个细胞), 于 37℃ 孵箱中静置 8 h。室温固定, 苏木素染色, 盐酸乙醇分化, 显微镜下计数每视野中 ($\times 400$) 细胞, 每张滤膜随机选取 5 个视野。计数原则为大于细胞体积的 1/2 跨过微孔到下室面, 或细胞大面积堵住微孔才计入。

1.7 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.5 软件进行统计分析, 组间比较用单因素方差分析 (1-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞原代培养及鉴定

细胞经 α -actin 免疫组织化学染色后, 可见细胞质中存在大量的向细胞两极呈放射状排列的肌丝 (图 1)。

2.2 单核细胞趋化因子 1 和 Fractalkine 对血管平滑肌细胞组织因子表达的影响

血管平滑肌细胞经 MCP-1 或 Fractalkine 单独刺激 8 h 后, TF 抗原表达量 (OD 值分别为 0.889 \pm 0.029 和 0.779 \pm 0.029) 显著增加 ($P < 0.01$)。MCP-1 和 Fractalkine 共同刺激 8 h 后, TF 抗原表达量 (OD 值为 0.622 \pm 0.045) 较 MCP-1 和 Fractalkine 单独刺激时明显降低 ($P < 0.01$), 但仍高于对照组 (OD 值

为 0.491 ± 0.028 , $P < 0.01$)。

2.3 单核细胞趋化因子 1 和 Fractalkine 对血管平滑肌细胞增殖的影响

Fractalkine 对平滑肌细胞有明显的促增殖作用, 但 MCP-1+ Fractalkine 和 MCP-1 均无明显促增殖作用, 且 MCP-1 在 48、96 h 有抑制增殖的作用(表 1)。

2.4 单核细胞趋化因子 1 和 Fractalkine 对血管平滑肌细胞的趋化作用

血管平滑肌细胞跨过微孔进入下室面, 可见少数细胞完全迁移穿出微孔, 分布于微孔周围; 少数细胞尚未迁移出微孔, 将微孔填充; 大多数细胞部分跨过微孔, 滤膜下室面仅见细胞一部分; 细胞核染色为深蓝色(图 2)。Fractalkine 和 MCP-1 + Fractalkine 对平滑肌细胞有显著趋化作用(OD 值分别为 $3.400 \pm$

1.673 和 6.200 ± 1.924 , $P < 0.05$), 且 MCP-1+ Fractalkine 趋化作用明显强于 Fractalkine($P < 0.05$); 而 MCP-1(OD 值为 1.200 ± 1.095) 无明显趋化作用(对照组 OD 值为 1.000 ± 0.707 , $P > 0.05$)。

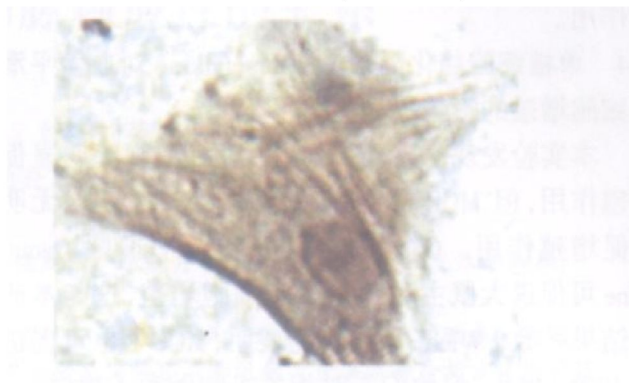


图 1. α -actin 免疫组织化学染色结果图 ($\times 400$)

表 1. 单核细胞趋化因子 1 和 Fractalkine 对平滑肌细胞增殖的影响

分 组	24 h	48 h	72 h	96 h
对照组	0.450 ± 0.021	0.512 ± 0.015	0.518 ± 0.015	0.538 ± 0.024
MCP-1 组	0.454 ± 0.027	0.464 ± 0.028^b	0.498 ± 0.008	0.511 ± 0.025^b
Fractalkine 组	0.527 ± 0.029^a	0.599 ± 0.027^a	0.582 ± 0.037	0.703 ± 0.027^a
MCP-1+ Fractalkine 组	0.465 ± 0.030	0.564 ± 0.033	0.517 ± 0.021	0.648 ± 0.036^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组同时时间比较; b 为 $P < 0.05$, 与 MCP-1 + Fractalkine 组同时时间比较。

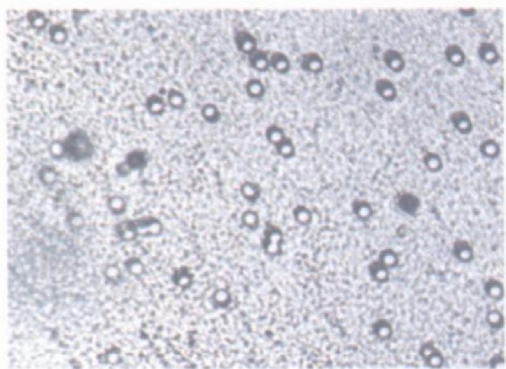


图 2. 平滑肌细胞趋化迁移至下室面图 ($\times 400$)

3 讨论

3.1 单核细胞趋化因子 1 对血管平滑肌细胞组织因子表达的影响

组织因子(TF)在 As 病变、血栓性并发症和冠状动脉介入治疗后再狭窄的形成过程中起至关重要的作用。本文结果表明 MCP-1 可增加 VSMC 中 TF 抗原的表达, MCP-1 可能通过促进细胞内 TF 表达而参与凝血酶的形成, 促进血栓形成, MCP-1 在促凝血过程中发挥了一定作用。Schechter 等^[1]得到类似的结果, 他们发现 MCP-1 能增强人主动脉平滑肌细胞和单核细胞白血病细胞的 TF mRNA 和蛋白表达,

MCP-1 还能增强平滑肌细胞表面 TF 的活性。Ernoffsson 等^[2]研究证明, MCP-1 还可诱导人外周血单核细胞表达 TF, 并呈剂量依赖性, 最有效的 MCP-1 浓度是 $50 \mu\text{g/L}$ (5.7 nmol/L)。我们在实验中所用浓度是 3 nmol/L , 得到类似结果。

3.2 Fractalkine 对血管平滑肌细胞组织因子表达的影响

本实验发现 Fractalkine 也可增加 VSMC 内 TF 抗原的表达, 说明 Fractalkine 作为另一类趋化因子在促凝血方面发挥了与 MCP-1 类似的作用。但这与 Ollivier 等^[3]得到的 Fractalkine 对体外培养的单核细胞有抗凝作用相反, 他们将 Fractalkine 作用于经脂多糖刺激的人外周血单核细胞, 结果发现 Fractalkine 存在条件下 TF 抗原和活性不但未增加反而降低。目前相关文章很少, 造成这两种相反的结论, 究其原因可能一方面与细胞种类不同有关; 另一方面, 脂多糖和 Fractalkine 均通过核因子 κB 途径调控 TF 转录, 可能有竞争抑制作用。

3.3 单核细胞趋化因子 1 和 Fractalkine 共同作用对血管平滑肌细胞组织因子表达的影响

本实验发现 MCP-1 和 Fractalkine 共同作用后, TF 抗原的表达较 MCP-1 或 Fractalkine 单独作用时明

显降低,而不是两者作用效果的叠加。这一方面可能因为 MCP-1 和 Fractalkine 都通过核因子 κ B 途径调控 TF 转录,产生竞争性抑制作用;另一方面可能是两者在 As 形成过程中有变异,不能正常发挥其生理作用。

3.4 单核细胞趋化因子 1 和 Fractalkine 对血管平滑肌细胞增殖的影响

本实验发现 Fractalkine 对平滑肌细胞有明显促增殖作用,但 MCP-1+ Fractalkine 和 MCP-1 均无明显促增殖作用。Chandrasekar 等^[4]研究证明 Fractalkine 可促进大鼠主动脉平滑肌细胞增殖,这与本研究结果一致。Viedt 等^[5]研究表明, MCP-1 也可促进人 VSMC 增生,但他们未对相关机制做深入探讨。

3.5 单核细胞趋化因子 1 和 Fractalkine 对血管平滑肌细胞趋化的影响

平滑肌细胞的迁移趋化由炎性因子介导,本实验研究表明 Fractalkine、MCP-1+ Fractalkine 对 VSMC 有明显的趋化作用, MCP-1 和 Fractalkine 相互促进,而 MCP-1 的趋化作用不强。这与 Ollivier 等^[3]的结果一致,他们认为 Fractalkine 对 VSMC 产生趋化作用,使其向 Fractalkine 浓度较高的炎症区域迁移,其作用机制为可溶型 Fractalkine 通过激活 CX3CR1 耦连的 G 蛋白信号传导途径而发挥趋化作用。但 Lo 等^[6]最新研究认为 MCP-1 有趋化平滑肌细胞的作用,而本实验中 MCP-1 的趋化作用不够明显,可能因本实验中 MCP-1 未采用最佳作用浓度,或采用的 MCP-1 试剂生物活性欠佳,或 MCP-1 的作用时相在作用 8 h 之外。MCP-1+ Fractalkine 的趋化效果强于 Fractalkine 单独作用,可能的原因是 MCP-1 与

Fractalkine 有相互促进作用, MCP-1 的作用时相可能提前,使两者共同发挥趋化作用。

炎性介质在 As 发生发展过程中起重要作用,本实验研究了趋化因子 MCP-1 和 Fractalkine 对 VSMC 中 TF 的表达和 VSMC 趋化、增殖的影响。结果表明这两个趋化因子在 As 过程中起到了不同程度的作用,这对临床寻找阻断其表达的药物意义深远。趋化因子受体属于 G 蛋白耦连受体超家族,这类受体比较容易找到相应的小分子拮抗剂。如果能特异的阻断这些炎性介质的作用,对 As 的防治将起到推动作用。

[参考文献]

- [1] Schechter AD, Rollins BJ, Zhang YJ, Charo IF, Fallon JT, Rossikhina M, et al. Tissue factor is induced by monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle and THP-1 cells [J]. *J Biol Chem*, 1997, **272** (45): 28 568-573
- [2] Ernoffson M, Siegbahn A. Platelet-derived growth factor-BB and monocyte chemoattractant protein 1 induce human peripheral blood monocytes to express tissue factor [J]. *Thromb Res*, 1996, **83** (4): 307-320
- [3] Ollivier V, Faure S, Tarantino N, Chollet-Martin S, Deterre P, Combadiere C, et al. Fractalkine/CX3CL1 production by human aortic smooth muscle cells impairs monocyte procoagulant and inflammatory responses [J]. *Cytokine*, 2003, **21** (6): 303-311
- [4] Chandrasekar B, Mummidi S, Perla RP, Bysani S, Dulin NO, Liu F, et al. Fractalkine (CX3CL1) stimulated by nuclear factor κ B (NF- κ B)-dependent inflammatory signals induces aortic smooth muscle cell proliferation through an autocrine pathway [J]. *Biochem J*, 2003, **373** (Pt 2): 547-558
- [5] Viedt C, Vogel J, Athanasiou T, Shen W, Orth SR, Kubler W, et al. Monocyte chemoattractant protein 1 induces proliferation and interleukin 6 production in human smooth muscle cells by differential activation of nuclear factor- κ B and activator protein 1 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (6): 914-920
- [6] Lo IC, Shih JM, Jiang MJ. Reactive oxygen species and ERK 1/2 mediate monocyte chemoattractant protein 1-stimulated smooth muscle cell migration [J]. *J Biomed Sci*, 2005, **12** (2): 377-388

(此文编辑 许雪梅)