

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00033

氧化型低密度脂蛋白对单核巨噬细胞株 U937 表达 Siglec-1 蛋白及分泌细胞因子的影响

熊怡淞, 吴韦霖, 张玲珍, 周运恒, 韩志君, 仲人前*

第二军医大学长征医院实验诊断科, 全军医学免疫诊断中心, 全军临床免疫重点实验室, 上海 200003

[摘要] **目的** 探讨氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)的致动脉粥样硬化(AS)作用是否通过上调单核巨噬细胞表面 Siglec-1 的表达发挥作用。**方法** 制备 ox-LDL 并用不同浓度刺激人巨噬细胞株 U937, 48 h 后收集细胞和培养上清液, 分别用流式细胞仪和 RT-PCR 检测不同浓度 ox-LDL 刺激后 Siglec-1 蛋白和 Siglec-1 mRNA 的表达水平, 并用 ELISA 试剂盒测定培养上清液中 MIP-1 α 、MCP-1 和 IL-8 的浓度。**结果** 与对照组相比, ox-LDL 能刺激 U937 细胞表面 Siglec-1 蛋白和 Siglec-1 mRNA 表达升高($P < 0.01$), 培养上清液中 MIP-1 α 、MCP-1 和 IL-8 的表达升高($P < 0.01$), 并呈浓度依赖性。**结论** ox-LDL 的致 AS 作用可能部分是通过上调单核巨噬细胞表面 Siglec-1 蛋白表达而活化巨噬细胞, 分泌细胞因子和趋化因子诱导更多巨噬细胞和淋巴细胞的活化参与粥样斑块中的炎症反应。

[关键词] 动脉粥样硬化; 氧化型低密度脂蛋白; Siglec-1; 细胞因子类; 单核巨噬细胞

[中图分类号] R 541.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)01-0033-04

Influence of oxidized low-density lipoprotein on siglec-1 expression and cytokine secretion by U937 cells

XIONG Yi-song, WU Wei-lin, ZHANG Ling-zhen, ZHOU Yun-heng, HAN Zhi-jun, ZHONG Ren-qian*

Department of Laboratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Clinical Diagnosis Center of PLA, Key Lab of PLA Clinical Immunology, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective:** To explore the role of sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-one (Siglec-1) in oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL)-induced atherosclerotic inflammation. **Methods:** Ox-LDL was prepared by oxidization of native LDL; different concentrations of ox-LDL were used to treat U937 cells for 48 h. Cells and supernatants were collected. The expression of Siglec-1 protein and mRNA was examined by flow cytometry (FCM) and real-time quantitative RT-PCR, respectively. The levels of MIP-1 α , MCP-1 and IL-8 in the supernatants were determined by ELISA. **Results:** Stimulation with ox-LDL significantly increased Siglec-1 protein and mRNA in U937 cells compared with the control group ($P < 0.01$). Meanwhile, the levels of MIP-1 α , MCP-1 and IL-8 in the supernatants were also significantly increased in a concentration-dependent manner compared with those in the control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The proatherogenic effect of ox-LDL may be partly through up-regulating Siglec-1 expression in macrophages and enhancing the expression of inflammatory cytokines and chemokines. The activated macrophages recruit more macrophages and lymphocytes to the site of atherosclerotic plaques and exacerbate the inflammatory responses.

[Key words] atherosclerosis; oxidized low-density lipoprotein; Siglec-1; cytokines; mononuclear phagocyte

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(1):33-36]

血清中高浓度的低密度脂蛋白是冠心病的主要危险因素, 而氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)比其天然形式有更强的致动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)作用。Siglec-1(CD169)蛋白是特异表达在组织巨噬细胞上的一类免疫球蛋白样黏附分子, 有促进

细胞黏附和活化的作用。前期研究发现, 冠心病患者外周血的单核细胞上 Siglec-1 蛋白表达明显升高, 提示冠心病患者外周血单核细胞已部分激活^[1]。但目前关于其表达上调的原因不清楚, 推测是由 ox-LDL 刺激引起; 同时, 关于 Siglec-1 蛋白的胞内信

[收稿日期] 2009-07-09 **[接受日期]** 2009-12-10

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(“863”计划, 2006AA02Z496), 上海市科学技术委员会优秀学科带头人基金(07XD14013)。Supported by National High-tech R&D Program (“863” Program, 2006AA02Z496) and Excellent Leading Scientist Foundation of Shanghai Science and Technology Committee(07XD14013)。

[作者简介] 熊怡淞, 博士生。E-mail: xys10@163.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81886071, E-mail: rqzhong@yahoo.com

号转导通路也不清楚,推测是偶联其他膜受体引起单核巨噬细胞活化并产生炎性细胞因子、共刺激分子以及黏附分子等。鉴于此,本实验通过体外培养人单核巨噬细胞株 U937,研究 ox-LDL 刺激对单核巨噬细胞表达 Siglec-1 蛋白及分泌细胞因子的影响,以探讨 Siglec-1 蛋白在 ox-LDL 致 AS 中的可能作用。

1 材料和方法

1.1 材料及主要试剂 人髓系白血病细胞株 U937 购自中国科学院上海细胞生物学研究所,TRIzol 试剂、胎牛血清和 RPMI 1640 培养液均购自 Gibco 公司,低密度脂蛋白(LDL)购自 Calbiochem 公司,ReverTra AceTM 反转录试剂盒和 SYBR Green Realtime PCR 试剂盒购自 Toyobo 公司,Siglec-1 及内参 GAPDH 引物由上海生工生物工程服务技术有限公司合成,PE 标记小鼠抗人 Siglec-1 单抗购自 Santa Cruz 公司,同型对照抗体和 MCP-1、IL-8 ELISA 检测试剂盒购自 eBioscience 公司,MIP-1 α ELISA 检测试剂盒购自 R&D 公司。

1.2 LDL 的氧化修饰及鉴定 将 LDL 溶液置于透析袋中,用 0.01 mol/L 的 PBS(pH 7.4)室温透析 12 h;取出透析后的 LDL,置于含 5 μ mol/L CuSO₄ 的 PBS 中,37 $^{\circ}$ C 透析 12 h;取出透析袋,用含 0.1% EDTA 的 PBS 4 $^{\circ}$ C 透析 24 h;过滤除菌,4 $^{\circ}$ C 保存备用。LDL 的氧化修饰程度鉴定采用南京建成生物工程研究所试剂盒,以四乙基丙烷为标准品,用每毫克蛋白中丙二醛的含量表示。测得 LDL 的丙二醛含量为(2.32 \pm 0.26) nmol/mg,Cu²⁺ 氧化所得 ox-LDL 的丙二醛含量为(14.13 \pm 0.69) nmol/mg。

1.3 细胞株 U937 培养和 ox-LDL 刺激 U937 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养,每 24~48 h 传代一次。选取处于对数生长期的细胞,以 5 \times 10⁵/ml 接种于 24 孔板,分别用终浓度为 10、25、50、75、100 μ g/ml 的 ox-LDL 刺激 48 h,300 \times g 离心 5 min 收集细胞和培养上清液待用。

1.4 流式细胞仪检测 U937 细胞表面 Siglec-1 蛋白 收集 ox-LDL 刺激后的细胞悬液,用 PBS(含 0.1% BSA 和 0.05% 叠氮钠)洗 2 次,PBS 重悬细胞至 1 \times 10⁷/ml,取 100 μ l 重悬细胞加入 20 μ l PE 标记小鼠抗人 Siglec-1 单抗,混匀后室温避光孵育 30 min,PBS 洗 2 次,重悬于 500 μ l 含 0.5% 多聚甲醛的 PBS 中,上 Beckman Coulter FC500 流式细胞仪

检测。

1.5 RT-PCR 检测细胞 mRNA 表达 用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA,反转录成 cDNA,操作均按说明书进行。PCR 扩增用 50 μ l 体系:SYBR Green Realtime PCR Master Mix 25 μ l,双蒸水 13 μ l,上、下游引物各 1 μ l,cDNA(用双蒸水稀释 10 倍)10 μ l,每个样本做 3 复孔,以不加模板 cDNA 为阴性对照。ABI PRISM 7000 荧光定量 PCR 仪上进行扩增:50 $^{\circ}$ C 2 min,95 $^{\circ}$ C 10 min,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,循环 40 次。作融解曲线验证扩增产物的特异性,反应完成后设定基线值(Baseline)和阈值(Threshold),读取阈循环(Ct)值。

1.6 ELISA 检测培养上清液细胞因子 收集不同浓度 ox-LDL 刺激后的培养上清液,按不同比例稀释后,用 ELISA 试剂盒分别检测 MIP-1 α 、MCP-1 和 IL-8 的表达水平,操作按说明书进行。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计软件,标本平行重复检测 3 次,取均值,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组资料之间比较用方差分析,实验组与对照组之间两两比较采用 Dunnett-*t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 U937 细胞培养和 ox-LDL 刺激 U937 细胞在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中生长良好,当加入 ox-LDL 刺激后,随着时间延长,部分细胞出现死亡现象。经锥虫蓝染色,12 h 细胞着染率为 1%~3%,24 h 细胞着染率为 4%~6%,48 h 细胞着染率为 5%~10%。

2.2 流式细胞仪检测单核巨噬细胞株 U937 表面 Siglec-1 蛋白 流式细胞仪检测结果如图 1 所示。检测发现,Siglec-1 蛋白在未刺激的 U937 细胞上表达量较低,随着 ox-LDL 浓度的增加,Siglec-1 蛋白在 U937 细胞表面表达率逐渐增高,显著高于阴性对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),且其表达呈浓度依赖性,当 ox-LDL 浓度为 100 μ g/ml 时,Siglec-1 表达量最高。

2.3 RT-PCR 检测 Siglec-1 mRNA 表达 通过荧光定量 PCR 检测发现,随着 ox-LDL 浓度的不断增加,Siglec-1 mRNA 在 U937 细胞表达逐渐增高,除 ox-LDL 10 μ g/ml 组外($P>0.05$),其余各组均显著高于阴性对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),且其表达呈浓度依赖性,当 ox-LDL 浓度为 100 μ g/ml 时,Siglec-1 mRNA 表达量最高(图 2)。

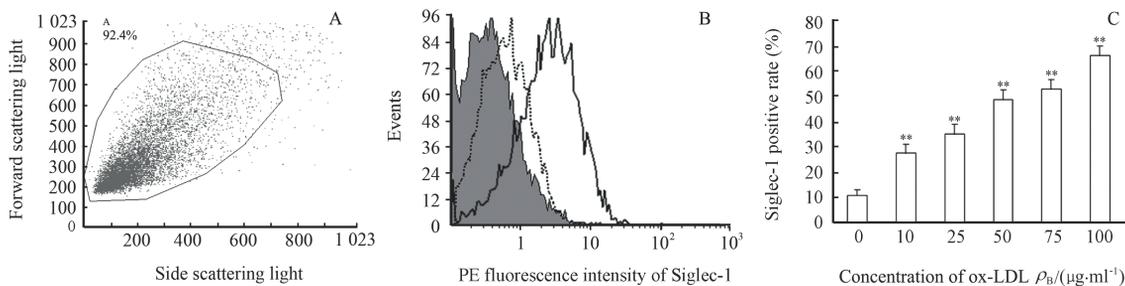


图 1 不同浓度 ox-LDL 刺激 U937 细胞株后 Siglec-1 蛋白的表达

Fig 1 Expression of Siglec-1 protein on U937 cells treated with different concentrations of ox-LDL

A: Gating based on forward angle scattering light and side light scatter; B: Siglec-1 fluorescence intensity histogram of different groups, the black area represents the negative control, dotted line represents non-stimulation group, solid line represents ox-LDL 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ stimulation group; C: Statistical analysis results. * * $P < 0.01$ vs control (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ox-LDL) group, $n = 9, \bar{x} \pm s$

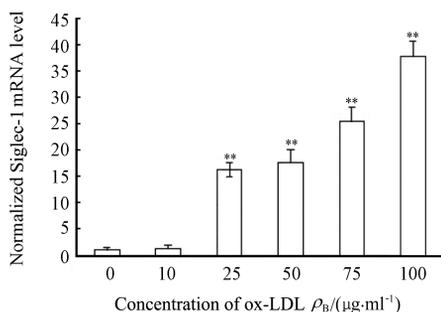


图 2 不同浓度 ox-LDL 刺激 U937 细胞株后 Siglec-1 mRNA 的表达

Fig 2 Expression of Siglec-1 mRNA on U937 cells treated with different concentrations of ox-LDL

* * $P < 0.01$ vs control (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ox-LDL) group, $n = 9, \bar{x} \pm s$

2.4 ELISA 检测培养上清液中细胞因子浓度 细胞培养上清液细胞因子检测结果见表 1。检测发现, ox-LDL 刺激 U937 后, 其分泌细胞因子 MIP-1 α 、MCP-1 和 IL-8 能力明显增强, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 1 不同浓度 ox-LDL 刺激 U937 细胞株后培养上清液中细胞因子的含量

Tab 1 Cytokine contents in supernatant of U937 cells treated with different concentrations of ox-LDL

($n = 9, \bar{x} \pm s$)

ox-LDL $\rho_B / (\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$	MCP-1 $\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})$	MIP-1 α $\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})$	IL-8 $\rho_B / (\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1})$
0	0.76 \pm 0.12	1.56 \pm 0.23	10.36 \pm 1.61
10	1.88 \pm 0.24 **	12.12 \pm 1.64 **	28.64 \pm 2.93 **
25	2.67 \pm 0.28 **	18.58 \pm 2.29 **	32.31 \pm 3.14 **
50	3.56 \pm 0.36 **	24.27 \pm 2.45 **	37.22 \pm 3.58 **
75	3.72 \pm 0.39 **	28.36 \pm 3.03 **	43.50 \pm 3.66 **
100	4.15 \pm 0.42 **	35.22 \pm 3.36 **	52.18 \pm 4.12 **

* * $P < 0.01$ vs control (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ox-LDL) group

3 讨论

Siglec-1 蛋白是唾液酸结合的免疫球蛋白样凝集素家族 (Siglecs 家族) 的第一个成员 [2], 主要表达在组织巨噬细胞上, 正常人外周血单核细胞上一般不表达。它的主要作用是通过识别含有唾液酸的糖链结构而促进细胞与细胞间黏附和相互作用, 调节免疫细胞的功能。在动物实验中发现它可作为病毒受体, 介导巨噬细胞对病毒的吞噬和清除 [3]。

Siglec-1 蛋白与人类疾病的研究报道不多, 目前主要集中在自身免疫性疾病和感染性疾病。研究发现, 当巨噬细胞受到炎症刺激时, Siglec-1 蛋白表达迅速上调, 提示 Siglec-1 蛋白在巨噬细胞促炎症反应中起重要作用。在类风湿性关节炎 [4]、HIV 感染伴高病毒载量 [5]、增殖性肾小球肾炎 [6]、系统性硬化 [7]、系统性红斑狼疮 [8] 等疾病中, 均可见 Siglec-1 蛋白在患者外周血或病变组织中表达的升高, 并参与 T 细胞激活等过程。上述发现证实了 Siglec-1 蛋白在介导巨噬细胞炎症反应及 T 细胞活化等过程中起重要作用。

AS 是一种多因素疾病, 其发病机制至今尚未阐明, 近年来认为它是一种免疫炎症性疾病 [9], 包括天然免疫和获得性免疫在内的免疫机制在 AS 的发病过程中起重要作用 [10], 特别是由巨噬细胞介导的天然免疫反应成为目前研究的热点。ox-LDL 作为 AS 发病过程中的重要因子, 广泛参与了血管内皮细胞破坏、巨噬细胞激活、淋巴细胞募集等过程, 并可通过激活巨噬细胞表面 TLR4 参与 AS 的发病 [11]。而 Siglec-1 蛋白作为单核巨噬细胞激活的重要标志, 在冠心病患者外周血单核细胞上表达显著升高 [1], 提示 Siglec-1 蛋白可能是由于 ox-LDL 刺激后表达上调。增高的 Siglec-1 蛋白可能通过与血管内皮细胞表面含唾液酸结构的糖链结合而使单核细胞黏附于

血管内皮,向血管内皮下移动并激活,分泌 MCP-1、MIP-1 α / β 、IL-8 等趋化因子诱导更多的巨噬细胞和淋巴细胞募集和活化,参与 AS 的初始发病过程。

本实验中体外培养人单核巨噬细胞株 U937,并利用不同浓度 ox-LDL 刺激,以观察细胞表面 Siglec-1 蛋白表达变化以及细胞活化后分泌细胞因子的能力,初步探讨 ox-LDL 的致 AS 作用是否通过激活巨噬细胞表面 Siglec-1 蛋白分子引起相关的炎性细胞因子和趋化因子分泌而起作用。实验发现,经不同浓度 ox-LDL 刺激后,细胞表面 Siglec-1 蛋白表达明显增加 ($P < 0.01$), Siglec-1 mRNA 也明显升高 ($P < 0.01$),并与 ox-LDL 呈浓度依赖性关系。巨噬细胞分泌 MIP-1 α 、MCP-1 和 IL-8 的量也随着 ox-LDL 浓度不断增加而增加。该结果初步提示 ox-LDL 的致 AS 作用可能部分是通过上调巨噬细胞表达 Siglec-1 蛋白而引起。增加表达的 Siglec-1 蛋白可能与巨噬细胞表面其他膜受体如清道夫受体、氧化型低密度脂蛋白受体 (LOX-1)、Fc γ R 等协同作用内吞脂质; Siglec-1 蛋白还可能与 TLR 等受体偶联激活胞内信号传导通路,引起 NF- κ B 活化以及 MIP-1 α 、MCP-1、IL-8 等炎性细胞因子和趋化因子分泌,诱导和活化更多巨噬细胞、CD4 $^+$ T 和 CD8 $^+$ T 淋巴细胞参与 AS。

本研究结果提示,ox-LDL 的致 AS 作用可能部分是通过上调巨噬细胞表面 Siglec-1 蛋白表达和相关炎性细胞因子分泌而引起,由 Siglec-1 蛋白介导的巨噬细胞炎症反应在 AS 的发生发展中起一定作用。但是 Siglec-1 蛋白在 AS 发病过程中究竟起到什么作用?其下游机制如何?是否如上推测通过协同清道夫受体吞噬脂质或与 TLR 等受体偶联分泌大量炎性细胞因子、活化 T 淋巴细胞等而参与 AS 发病?这些仍需要进一步研究探索。

[参考文献]

- [1] 熊怡淞,王皓,吴炜霖,周运恒,梁艳,杨再兴,等.定量 RT-PCR 测定冠心病患者外周血 Siglec-1 (CD169) 的基因表达水平[J].第二军医大学学报,2008,29:1307-1310.
Xiong Y S, Wang H, Wu W L, Zhou Y H, Liang Y, Yang Z X,

et al. Real-time quantitative RT-PCR in measuring Siglec-1 gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells of patients with coronary heart disease[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29: 1307-1310.

- [2] Crocker P R, Paulson J C, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system[J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7: 255-266.
- [3] Delpitte P L, Van Breedam W, Barbé F, Van Reeth K, Nauwynck H J. IFN-alpha treatment enhances porcine Arterivirus infection of monocytes *via* upregulation of the porcine Arterivirus receptor sialoadhesin[J]. J Interferon Cytokine Res, 2007, 27: 757-766.
- [4] Hartnell A, Steel J, Turley H, Jones M, Jackson D G, Crocker P R. Characterization of human sialoadhesin, a sialic acid binding receptor expressed by resident and inflammatory macrophage populations[J]. Blood, 2001, 97: 288-296.
- [5] Pulliam L, Sun B, Rempel H. Invasive chronic inflammatory monocyte phenotype in subjects with high HIV-1 viral load[J]. J Neuroimmunol, 2004, 157: 93-98.
- [6] Ikezumi Y, Suzuki T, Hayafuji S, Okubo S, Nikolic-Paterson D J, Kawachi H, et al. The sialoadhesin (CD169) expressing a macrophage subset in human proliferative glomerulonephritis[J]. Nephrol Dial Transplant, 2005, 20: 2704-2713.
- [7] York M R, Nagai T, Mangini A J, Lemaire R, van Seventer J M, Lafyatis R. A macrophage marker, Siglec-1, is increased on circulating monocytes in patients with systemic sclerosis and induced by type I interferons and toll-like receptor agonists[J]. Arth Rheum, 2007, 56: 1010-1020.
- [8] Biesen R, Demir C, Barkhudarova F, Grün J R, Steinbrich-Zöllner M, Backhaus M, et al. Sialic acid-binding Ig-like lectin 1 expression in inflammatory and resident monocytes is a potential biomarker for monitoring disease activity and success of therapy in systemic lupus erythematosus[J]. Arth Rheum, 2008, 58: 1136-1145.
- [9] Hansson G K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease[J]. N Engl J Med, 2005, 352: 1685-1695.
- [10] Hansson G K, Libby P, Schonbeck U, Yan Z Q. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. Circ Res, 2002, 91: 281-291.
- [11] Miller Y I, Viriyakosol S, Worrall D S, Boullier A, Butler S, Witztum J L. Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25: 1213-1219.

[本文编辑] 陈波