论著

文章编号:1000-5404(2005)15-1566-04

兔动脉粥样硬化斑块处单核细胞趋化蛋白-1的表达

聂永梅[1],陈槐卿[1],成 敏[1],邓伊伶[2] (四川大学华西医学中心:[1]中心生物医学工程研究室,[2]病理研究室,成都 610041)

提 要:目的 了解单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)在动脉粥样硬化中的作用。**方法** 采用免疫组化、双抗夹心ELISA和原位杂交的方法,检测MCP-1蛋白在兔动脉粥样硬化斑块处的表达及定位MCP-1 mRNA的表达。**结果** 8、12周模型组内膜显著增厚并有明显阳性染色,半定量分析动脉粥样硬化模型组阳性染色的面积分别是对照组的2.04、3.32倍,平均积分光密度(IOD)值分别是对照组的2.33、3.43倍。8、12周动脉粥样硬化模型组MCP-1蛋白含量与总蛋白比值和对照组比较均有显著性差异,分别是对照组的2.90、3.58倍。8周模型组血管内膜有强的阳性染色,MCP-1 mRNA的表达增加。**结论** MCP-1的蛋白和基因上调主要是在高脂血症兔动脉粥样硬化模型的脂纹期。MCP-1参与动脉粥样硬化斑块的形成,主要在动脉粥样硬化的早期。

关键词:单核细胞趋化蛋白-1;动脉粥样硬化;免疫组化;ELISA;原位杂交

中图法分类号:R341;R394.3;R543.502 **文献标识码**:A

Protein and gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 in atherosclerotic lesions of hyperlipemia rabbits

NIE Yong-mei[1], CHEN Huai-qing[1], CHENG Min[1], DENG Yi-ling[2] ([1]Department of Biomedical Engineering, West China Medical Center of Sichuan University, [2]Department of Pathology, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To establish the animal model of hyperlipemia in rabbits and investigate the changes of protein and gene expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the plaques of atherosclerosis and explore the temporal correlation between MCP-1 expression and plaque development. **Methods** A total of 30 New Zealand rabbits were randomly assigned into feed with ordinary diet and high lipid diet. In the rabbits with high lipid diet, 250 mg/kg bovine serum albumin was injected before animal model establishment, then every 15 d once more. The MCP-1 expression in the atherosclerosis plaques in aorta arch was detected by immunohistochemistry, ELISA, *in situ* hybridization on week 4, 8, 12 after hyperlipemia rabbits were sacrificed. **Results** Immunohistochemical results showed the expression of MCP-1 protein increased obviously in intima of hyperlipemia rabbits on week 8 and 12. Quantitative analysis showed MCP-1 positive area of atherosclerosis model was 2.04 times and 3.32 times as large as that of control group on week 8 and 12. The value of IOD of atherosclerosis model was 2.33 times and 3.43 times as high as that of control group on week 8 and 12. ELISA results showed the ratio of the MCP-1 protein to total protein of atherosclerosis model was 2.90 times and 3.58 times as high as that of control group on week 8 and 12. *In situ* hybridization showed positive location was strong in intima of hyperlipemia rabbits on week 8. **Conclusion** MCP-1 protein and gene expression was up-regulated in the development of fatty streaks in hyperlipemia rabbits. MCP-1 plays an important role in the early atherosclerotic lesions.

Key words: monocyte chemoattractant protein-1; atherosclerosis; immunohistochemistry; ELISA; *in situ* hybridization

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370735)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370735)

作者简介:聂永梅(1976-),女,重庆市大足县人,博士,讲师,主要从事细胞生物力学方面的研究。电话:(028)85502314,E-mail:nieyongmei@126.com

通讯作者:陈槐卿,电话:(028)85503400, E-mail:chq@wcums.edu.cn

收稿日期:2005-06-22;**修回日期**:2005-08-25

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是临床多发病,给人类的健康造成了极大的危害。已经证明炎症反应在动脉粥样硬化的病理过程中起了重要的作用[1]。炎症的发生要通过许多因子介导,例如黏附分子、细胞因子和趋化因子[2]。单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)是趋化因子 CC 亚家族成员之一,大量的研究也表明单核细胞的趋化主要是由 MCP-1 来实现的[3],多种物质及细胞因子都可以诱导 MCP-1 的表达,而 MCP-1 也可以在多种细胞尤其是构成动脉粥样硬化病变的 3 种主要细胞——单核/巨噬细胞、内皮细胞、平滑肌细胞中表达,从而直接或间接地参与了动脉粥样硬化的形成[4]。

体外实验都表明在炎症和高脂血症情况下,MCP-1 对于募集单核细胞进入血管壁的过程起着重要作用。MCP-1 在人和动物模型动脉粥样硬化斑块处的表达也已经被检测。Chen 等[5]研究了动脉粥样硬化的起始阶段 MCP-1 mRNA 和蛋白表达,用免疫组化、原位杂交和 Northern blot 的方法检测了不同时相点(1、3 d、1、3、6 周)的高脂血症兔动脉粥样硬化斑块处 MCP-1 mRNA 和蛋白表达。本研究通过建立动脉粥样硬化模型动态观察了在整个动脉粥样硬化过程中包括早期和后期 MCP-1 的蛋白和基因表达,探讨了 MCP-1 与动脉粥样硬化的关系,以更加深入地了解 MCP-1 在动脉粥样硬化形成机制中的作用。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　　健康雄性新西兰白兔 30 只,四川大学实验动物中心提供,体质量 2.0 ~ 2.2 kg,并由此实验中心饲养和提供观察场地;普通饲料(本校实验动物中心提供);高脂饲料成分:83% 普通饲料、5% 猪油、10% 蛋黄、2% 胆固醇(Japan 进口分装)/d。

1.1.2　试剂与仪器　　牛血清白蛋白(美国 Amresco 公司);山羊抗人 MCP-1 多克隆抗体(美国 Santa Cruz Biotech 公司);S-P 9003 免疫组化染色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);OLYSA 软件(日本 Olympus 公司);高速匀浆仪(华西口腔医学院教育部重点实验室免疫室自制);兔 MCP-1 的 ELISA 试剂盒(美国 DR lab);多孔板荧光/紫外高效分析仪(美国 PERKIN ELMER 公司,HTS 7000 Plus);DEPC(美国 Amresco 公司);原位杂交 MCP-1 探针(上海申能生物公司);原位杂交探针稀释液(武汉博士德);原位杂交检测试剂盒(荷兰 Panpath 公司);封片剂 Clearmount™(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.2　方法

1.2.1　建立动物模型　　建立高脂血症动脉粥样硬化斑块实验模型的方法是:正常新西兰白兔分笼饲养观察 1 周后,一次性静脉注射牛血清白蛋白(250 mg/kg)[6],即日开始饲喂高脂饲料 100 g/d。饲喂 15 d 后再注射 1 次牛血清白蛋白(250 mg/kg)。

1.2.2　分组　　实验分为对照组和高脂血症动脉粥样硬化模型组(AS 模型组),造模时间为 4、8、12 周,每个时间点 5 只。对照组以普通饲料喂养,100 g/d 饲喂,自由饮水;AS 模型组造模方法如1.2.1所述。

1.2.3　取材　　按照造模时间 4、8、12 周处死动物,分别取对照组和模型组动物的主动脉升弓部血管,一部分用 10% 中性甲醛固定后石蜡包埋,用于做免疫组化和原位杂交;另一部分放入冻存管保存在液氮中,用于组织匀浆后的 ELISA 测定。

1.2.4　MCP-1 蛋白含量测定

1.2.4.1　免疫组化　　染色采用 S-P 法。石蜡切片脱蜡至水,3% H_2O_2 避光孵育 20 min,蒸馏水、PBS 各洗 5 min。用枸橼酸盐缓冲液微波抗原修复 15 min,取出迅速冷却,PBS 洗 2 次各 5 min。滴加封闭液,37 ℃孵育 30 min,倾去不洗。加用 PBS 按 1∶100 稀释的 Goat anti-MCP-1(sc-1785)一抗,37 ℃孵育 30 min,然后 4 ℃过夜。PBS 洗 2 次各5 min,加生物素标记兔抗山羊 IgG,37 ℃孵育 30 min。PBS 洗 2 次各5 min,加辣根酶标记的链霉卵白素工作液,37 ℃孵育 30 min。PBS 洗 2 次各 5 min,DAB 显色。以 PBS 代替一抗做空白对照。用苏木精复染,脱水、透明,中性树胶封片。用 Image-Pro Plus 5.0 图像分析系统对染色结果进行半定量分析。

1.2.4.2　兔血管组织匀浆液双抗夹心 ELISA 测定　　用兔 MCP-1 定量 ELISA 试剂盒测定兔血管组织匀浆液中的 MCP-1 含量。

1.2.5　MCP-1 mRNA 测定　　寡核苷酸探针序列设计根据 GenBank 兔 MCP-1 全长 mRNA 序列(序列号为 M57440)设计:5′-CAAAGACTTTGACCTCTTATTCCACAACCCAAGAAC-3′,5′端用地高辛标记。探针用原位杂交稀释液按照 10 ng/μl 稀释。按照试剂盒操作说明进行。用 AEC(3-氨基-9-乙基咔唑)显色,甲基绿复染。

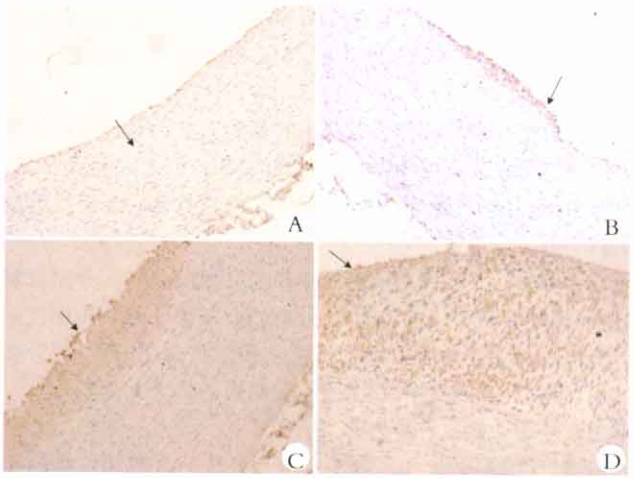
1.3　统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件行配对 t 检验。

2　结果

2.1　MCP-1 免疫组化结果

采用免疫组化的方法检测 MCP-1 蛋白的表达,对照组主动脉升弓部血管内膜的内皮细胞有棕黄阳性染色(图 1A),造模 4 周 AS 模型组内膜轻微增厚并有阳性染色(图 1B),造模 8、12 周 AS 模型组内膜显著增厚并有明显阳性染色(图 1C、D)。4、8、12 周 AS 模型组兔血管壁中膜平滑肌细胞也有少量 MCP-1 的表达。根据免疫组化 MCP-1 表达的半定量分析(表 1),AS 模型组阳性染色的面积高于对照组,8、12 周 AS 模型组阳性染色的面积分别是对照组的 2.04、3.32 倍($P < 0.05$)。8、12 周 AS 模型组的 IOD 值分别是对照组的 2.33、3.43 倍($P < 0.05$)。随着造模时间的增加,AS 模型组可以明显观察到阳性染色增强,MCP-1 的蛋白表达增加。



A：对照组；B：4 周 AS 模型组；C：8 周 AS 模型组；D：12 周 AS 模型组；↓：内膜

图 1 兔主动脉血管 MCP-1 免疫组化定位染色 （S-P×200）

表 1 主动脉升弓部血管 MCP-1 表达的免疫组化半定量分析（$n=30$，$\bar{x}\pm s$）

造模时间（周）	组别	面积（μm^2）	密度	IOD
4	对照组	112.661 ±8.73	156.52 ± 15.51	19.67 ±2.02
	模型组	119.71 ±23.93	159.56 ± 1.08	22.60 ±8.18
8	对照组	97.60 ±11.72	156.16 ±4.39	19.87 ±7.09
	模型组	198.03 ±48.02[a]	159.00 ±1.15	46.23 ±3.07[a]
12	对照组	92.68 ±6.48	162.21 ±10.85	19.76 ±0.13
	模型组	307.46 ±25.68[a]	164.67 ±7.76	67.83 ±2.86[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较

2.2 MCP-1 蛋白 ELISA 测定结果

用双抗夹心 ELISA 法测定兔血管组织匀浆液中的 MCP-1 蛋白表达量，12 周 AS 模型组 MCP-1 蛋白含量与对照组比较显著差异（$P<0.01$），是对照组的 2.62 倍。AS 模型组与对照组的总蛋白比较没有差异。8、12 周 AS 模型组 MCP-1 蛋白与总蛋白含量比值和对照组比较均有显著性差异（$P<0.01$），分别是对照组的 2.90、3.58 倍（表 2）。

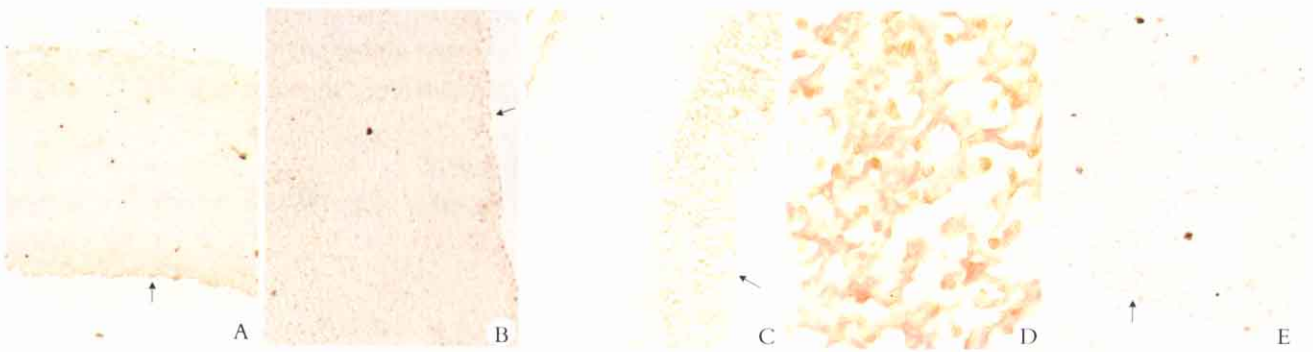
表 2 主动脉升弓部血管组织匀浆 MCP-1 蛋白含量与动脉粥样硬化进程的关系（$n=30$，$\bar{x}\pm s$）

造模时间（周）	组别	MCP-1（pg/ml）	总蛋白（mg/ml）	MCP-1 蛋白与总蛋白含量比值（pg/mg）
4	对照组	77.12 ±19.66	3.64 ±0.71	21.53 ±5.74
	模型组	123.81 ±16.25[a]	3.78 ±0.46	32.77 ±0.92[b]
8	对照组	69.22 ±21.72	3.01 ±0.80	22.94 ±3.44
	模型组	180.63 ±36.75[b]	2.82 ±0.80	66.67 ±14.33[b]
12	对照组	66.79 ±21.35	2.62 ±0.92	25.79 ±3.09
	模型组	298.41 ±34.47[b]	3.22 ±0.22	92.45 ±6.25[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

2.3 原位杂交结果

用原位杂交的方法定位 MCP-1 mRNA 的表达，AEC 显色为红色阳性染色。对照组血管内膜的内皮细胞质表达 MCP-1 mRNA（图 2A），4 周 AS 模型组血管内膜的内皮细胞及其下的单核-巨噬细胞细胞有阳性染色（图 2B），8 周 AS 模型组血管内膜有强的阳性染色（图 2C、D），12 周 AS 模型组血管内膜及中膜平滑肌细胞均有弱的阳性染色（图 2E）。AS 模型组中膜平滑肌细胞也有弱的阳性染色。随着造模时间的增加，8 周 AS 模型组可以明显观察到阳性染色增强，MCP-1 mRNA 的表达增加。



A：对照组（×200）；B：4 周 AS 模型组（×200）；C：8 周 AS 模型组（×200）；D：8 周 AS 模型组（×400）；E：12 周 AS 模型组（×200）；↓：内膜

图 2 兔主动脉血管 MCP-1 mRNA 原位杂交定位染色

3 讨论

MCP-1 是 CC 趋化因子亚家族分子质量为 14×10^3 的糖蛋白，对单核细胞募集有强的趋化作用[7]。MCP-1 由各种类型的细胞表达，主要包括单核细胞、平滑肌细胞和由 IL-1、TNF-α 和 IgG 刺激的人血管内皮细胞表达[8]。MCP-1 已经被认为是动脉粥样硬化起始炎症过程的关键因子。已经发现在动脉粥样硬化动脉血管组织中的内皮细胞、巨噬细胞和血管平滑肌细胞都有 MCP-1 mRNA 表达。因此，MCP-1 在动脉粥样硬化斑块的起始和形成过程中是重要的。

本研究采用高胆固醇高脂饮食与免疫反应损伤法

结合制备高脂血症兔动脉粥样硬化模型,通过双抗夹心 ELISA 法测定血管组织匀浆液中和采用免疫组化的方法定位主动脉升弓部动脉粥样硬化斑块处 MCP-1 的蛋白表达,随着动脉粥样硬化的进程,MCP-1 的蛋白表达是增加的。采用原位杂交的方法检测主动脉升弓部动脉粥样硬化斑块处 MCP-1 mRNA 表达,在 8 周时的动脉粥样硬化早期脂纹期有明显的表达。这可能的原因是在 12 周模型组已经是纤维斑块期,细胞出现坏死和崩解,因此导致 IL-8 mRNA 表达减弱,而蛋白表达仍然增高。正常对照组内皮细胞表达 MCP-1,4 周动脉粥样硬化模型组内皮细胞和侵入内皮细胞下的少量单核细胞表达 MCP-1,血管壁中膜平滑肌细胞表达很少的 MCP-1。在动脉粥样硬化的早期,MCP-1 的蛋白和基因表达都上调。MCP-1 是一种单核细胞趋化活化因子,能使血液中的单核细胞迁入内膜下,活化为巨噬细胞,吞噬脂质形成泡沫细胞,在动脉粥样硬化的早期起着重要作用。MCP-1 是一个作用极强的单核细胞趋化因子,不仅具有吸附单核细胞移动的功能,而且对血管内皮细胞黏附分子的表达亦具有调节作用。Schwartz 等[9]证明 MCP-1 为作用很强的单核细胞趋化因子,具有调节血管内皮表达相关黏附分子的作用,显示其具有调节单核细胞黏附和进入动脉壁的双重功能,在单核细胞进入动脉内膜的过程中具有十分重要的作用。Deo 等[10]的研究表明血浆 MCP-1 的水平是和动脉粥样硬化传统的危险因子(如 C 反应蛋白)相关的,支持了 MCP-1 可能介导这些危险因子的致动脉粥样硬化效应的假说。MCP-1 在人动脉粥样硬化斑块处的巨噬细胞、内皮细胞和平滑肌细胞中都有表达,对单核细胞还有 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 淋巴细胞有趋化活性[11,12]。Nelken 等[13]用原位杂交方法检测出动脉粥样硬化斑块中的平滑肌细胞有 MCP-1 mRNA 的表达,进一步说明其在单核细胞迁入内皮下间隙的过程中有重要作用。Boring 等[14]为了研究 MCP-1 在动脉粥样硬化中的作用,将 CCR2(MCP-1 的受体)基因缺失鼠($CCR2^{-/-}$)和载脂蛋白 E(apo-E)基因缺失鼠($apo\text{-}E^{-/-}$)杂交,结果显示 CCR2 的缺失可显著减少动脉粥样硬化的发生。类似的研究也表明在 apo-E 基因缺失鼠($apo\text{-}E^{-/-}$),MCP-1 过表达加速动脉粥样硬化和斑块中巨噬细胞增加的数目相关[15]。

本研究动态监测了 4、8、12 周高脂血症兔动脉粥样硬化模型中 MCP-1 的蛋白和基因表达,结果表明 MCP-1 的蛋白和基因上调主要是在 8 周高脂血症兔动脉粥样硬化模型的脂纹期,MCP-1 在动脉粥样硬化的炎症过程中起着重要作用。

参考文献:

[1] LIBBY P. Inflammation in atherosclerosis[J]. Nature, 2002, 420(6917): 868-874.

[2] SHIN W S, SZUBA A, ROCKSON S G. The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights[J]. Atherosclerosis, 2002, 160(1): 91-102.

[3] GERARD C, ROLLINS B J. Chemokines and disease[J]. Nat Immunol, 2001, 2(2): 108-115.

[4] ROLLINS B J. Chemokines[J]. Blood, 1997, 90(3): 909-928.

[5] CHEN Y L, CHANG Y J, JIANG M J. Monocyte chemotactic protein-1 gene and protein expression in atherogenesis of hypercholesterolemic rabbits[J]. Atherosclerosis, 1999, 143(1): 115-123.

[6] 汪　谦. 现代医学实验方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 995.

[7] ADAMS D H, LLOYD A R. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines[J]. Lancet, 1997, 349(9050): 490-495.

[8] SICA A, WANG J M, COLOTTA F, *et al*. Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor[J]. J Immunol, 1990, 144(8): 3034-3038.

[9] SCHWARTZ C J, VALENTE A J, SPRAGUE E A, *et al*. Atherosclerosis. Potential targets for stabilization and regression[J]. Circulation, 1992, 86(6 Suppl): Ⅲ117-Ⅲ123.

[10] DEO R, KHERA A, MCGUIRE D K, *et al*. Association among plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1, traditional cardiovascular risk factors, and subclinical atherosclerosis[J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 44(9): 1812-1818.

[11] TAKEYA M, YOSHIMURA T, LEONARD E J, *et al*. Detection of monocyte chemoattractant protein-1 in human atherosclerotic lesions by an anti-monocyte chemoattractant protein-1 monoclonal antibody[J]. Hum Pathol, 1993, 24(5): 534-539.

[12] TAUB D D, PROOST P, MURPHY W J, *et al*. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes[J]. J Clin Invest, 1995, 95(3): 1370-1376.

[13] NELKEN N A, COUGHLIN S R, GORDON D, *et al*. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques[J]. J Clin Invest, 1991, 88(4): 1121-1127.

[14] BORING L, GOSLING J, CLEARY M, *et al*. Decreased lesion formation in CCR2-/-mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis[J]. Nature, 1998, 394(6696): 894-897.

[15] DAWSON T C, KUZIEL W A, OSAHAR T A, *et al*. Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Atherosclerosis, 1999, 143(1): 205-211.

(编辑　栾　嘉)