DOI:10.16016/j.1000-5404.201510056

蛋白结合硫酸吲哚酚对单核细胞趋化功能的影响

施正敏,周宝尚,陈 雨,龚 艺,袁发焕 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院肾内科)

[摘要] **目的** 研究蛋白结合硫酸吲哚酚(indoxyl sulfate,IS)对单核细胞趋化功能的影响及其可能机制。**方法** 以4%人血白蛋白(human serum albumin,HSA)结合游离的IS制备蛋白结合IS,高效液相色谱法(HPLC)检测其蛋白结合率。CCK-8法检测人单核细胞(THP-1)经不同浓度的游离IS和蛋白结合IS分别作用24 h后细胞增殖能力的变化。200 μmol/L游离IS和蛋白结合IS分别孵育THP-1细胞24 h后,Transwell小室法检测THP-1细胞趋化能力;ELISA法检测细胞培养上清中单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)浓度;流式细胞术检测THP-1细胞上CC类趋化因子受体2(CCR2)的表达水平。**结果** 成功制备蛋白结合IS,其蛋白结合率约为90%;蛋白结合IS和游离IS均可抑制THP-1细胞增殖,且蛋白结合IS对THP-1细胞的增殖抑制作用具有浓度依赖性($P<0.05$);蛋白结合IS和游离IS均可增强THP-1细胞的趋化活性($P<0.05$);蛋白结合IS和游离IS均可使THP-1细胞的MCP-1和CCR2表达上调($P<0.05$)。**结论** 蛋白结合IS同游离IS一样,可通过上调MCP-1及CCR2的表达增强单核细胞的趋化功能。

[关键词] 蛋白结合毒素;硫酸吲哚酚;单核细胞
[中图法分类号] R331.142; R341; R692.602 [文献标志码] A

Effect of albumin-bound indoxyl sulfate on the chemotaxis in monocytes

Shi Zhengmin, Zhou Baoshang, Chen Yu, Gong Yi, Yuan Fahuan (Department of Nephrology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of albumin-bound indoxyl sulfate (IS) on the activity of chemotaxis in the monocytes and investigate its underlying potential mechanism. **Methods** Different concentrations of IS were bound to 4% human serum albumin (HAS), and the binding efficiency was evaluated by high-performance liquid chromatography (HPLC). CCK-8 assay was employed to evaluate the proliferation of THP-1 cells after exposure to free IS and albumin-bound IS at different doses for 24 h. After free and albumin-bound IS were respectively incubated with THP-1 cells for 24 h, Transwell chemotaxis chamber was used to measure the chemotaxis, ELISA was employed to evaluate the contents of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and flow cytometry was adopted to detect the protein expression of chemokine receptor CCR2. **Results** The protein binding efficiency of albumin-bound IS was about 90%. Both free and albumin-bound IS suppressed the proliferation of THP-1 cells ($P<0.05$), and up-regulated the MCP-1 and CCR2 in THP-1 cells in a dose-dependent manner ($P<0.05$). **Conclusion** Albumin-bound IS, like free one, enhances the chemotaxis of monocytes by up-regulating the expression of MCP-1 and CCR2. Eliminating albumin binding IS is beneficial to reduce cardiovascular events, inflammation, and infection-related complications in uremic patients.

[**Key words**] protein-bound uremic toxins; indoxyl sulfate; monocytes

Corresponding author: Yuan Fahuan, E-mail: yuanfh023@126.com

[通信作者] 袁发焕,E-mail:yuanfh023@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160131.1127.007.html(2016-01-31)

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)患者体内尿毒素蓄积,对机体的多个系统均可造成不良影响。欧洲尿毒素研究组(European uremic toxin work group, EUTox)根据尿毒素的理化性质将其分为小分子水溶性物质、中分子物质及蛋白结合毒素三类[1]。很多小分子毒素,譬如硫酸吲哚酚(indoxyl sulfate,IS)可与血浆白蛋白结合,导致常规透析难以将其清除[2]。研究表明,CKD 患者体内 IS 的蓄积可促进心血管事件和感染等并发症的发生,其发病机制至今尚未完全明确,可能与氧化应激、炎症反应、免疫功能障碍等有关[3-6]。新近研究发现,单核巨噬系统在上述机制中可能发挥重要作用[7-8]。既往关于 IS 的体外研究多以游离毒素进行实验,忽略了 IS 的蛋白结合特性。本研究以人单核细胞作为研究对象,观察蛋白结合 IS 对单核细胞趋化功能的影响,并初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人单核细胞株 THP-1(美国 ATCC 细胞库),RPMI 1640 培养基、胎牛血清(美国 HyClone),硫酸吲哚酚、人血白蛋白(美国 Sigma),CCK-8 试剂盒(日本同仁),Amicon Ultra-15 离心过滤器(30 K, Millipore),Transwell 小室(8 μm,24 孔,美国 Millipore),MCP-1 ELISA 试剂盒(美国 eBioscience),PE 标记的抗人 CCR2 多克隆抗体及其同型对照(美国 BioLegend),PBS、多聚甲醛、结晶紫(第三军医大学中心实验室)。

1.2 方法

1.2.1 THP-1 细胞培养、蛋白结合硫酸吲哚酚的配制及鉴定 THP-1 细胞用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基在 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养,2 ~ 3 d 换液 1 次。蛋白结合 IS 的配制:参考文献[1]中 CKD 患者的血清总 IS 水平,将不同浓度的 IS 溶液(100、200、400、800 μmol/L)与 4% HSA 溶液混合均匀,37 ℃ 水浴作用 2 h 得蛋白结合 IS 溶液。将蛋白结合 IS 溶液 4 ℃预冷 20 min,转入超滤膜为 30 K 的 Amicon Ultra-15 离心过滤器,4 ℃、3 500 × g 离心 20 min,收集下层离心管中超滤液行高效液相色谱检测。计算蛋白结合 IS 溶液中 IS 的蛋白结合率。蛋白结合率 = (1 - 超滤液峰面积/标准品峰面积) × 100%。

1.2.2 CCK-8 检测细胞增殖率 收集对数生长期的 THP-1 细胞,1 × 10^5/mL,100 μL/孔接种于 96 孔板,完全培养基培养 24 h。向培养板中加入不同浓度的游离 IS(100、200、400、800 μmol/L)和蛋白结合 IS(4% HSA + IS 100、200、400、800 μmol/L),游离组和蛋白结合组的对照分别加入等量的 PBS 和 4% HSA 溶液,同时设不含细胞只含完全培养基的空白调零组。每组设置 3 个复孔,每孔反应体系总体积为 110 μL。培养 24 h 向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液继续培养 1.5 h,用酶标仪测定在 450 nm 处的光密度值[D(450)],实验重复 3 次。以空白调零组 D(450)值均数调零,以平行孔的平均 D(450)值作为各实验组的 D(450)值,细胞增殖率 = [实验组 D(450)值 - 调零组 D(450)值]/[对照组 D(450)值 - 调零组 D(450)值] × 100%。

1.2.3 Transwell 趋化实验 后续实验分组:空白对照组(PBS 溶液),阴性对照组(4% HSA 溶液),游离 IS 组(IS 200 μmol/L),蛋白结合 IS 组(4% HSA + IS 200 μmol/L)。趋化实验采用 Transwell 小室模型,下室加入 500 μL 含 10% FBS 的 RPMI1640 完全培养基;收集无血清 1640 培养基孵育 12 h 的 THP-1 细胞,4 × 10^5/mL,每室 200μL 接种于上室,按实验分组孵育细胞 24 h。取出小室,PBS 棉球擦拭上室,4% 多聚甲醛固定 30 min,0.1% 结晶紫染色 20 min,PBS 漂洗后倒置显微镜观察计数,随机取 5 个视野,取平均值为趋化细胞数。

1.2.4 ELISA 法检测 MCP-1 浓度 收集对数生长期的 THP-1 细胞,4 × 10^5/mL,2 mL/孔接种于 6 孔板,无血清 1640 培养基孵育 12 h,按实验分组条件孵育 24 h。收集各组 THP-1 细胞培养上清液,用稀释液将各组样品稀释 10 倍后,按 ELISA 试剂盒说明书进行实验,用多功能酶标仪测定 450 nm 处的光密度值及 MCP-1 浓度。

1.2.5 流式细胞术检测 CCR2 THP-1 细胞在相应的实验条件下孵育 24 h 后,收集 1 × 10^6 个细胞加 PBS 定容至 100 μL,分别向细胞悬液中加入 PE 标记的抗人 CCR2 抗体与相应的同型对照抗体 5 μL,4 ℃避光孵育 1.5 h,冷 PBS 洗涤 2 次,离心去上清,每管细胞加入 2% 多聚甲醛 300 μL,流式细胞仪检测 THP-1 细胞表面 CCR2 的表达情况。

1.3 统计学分析

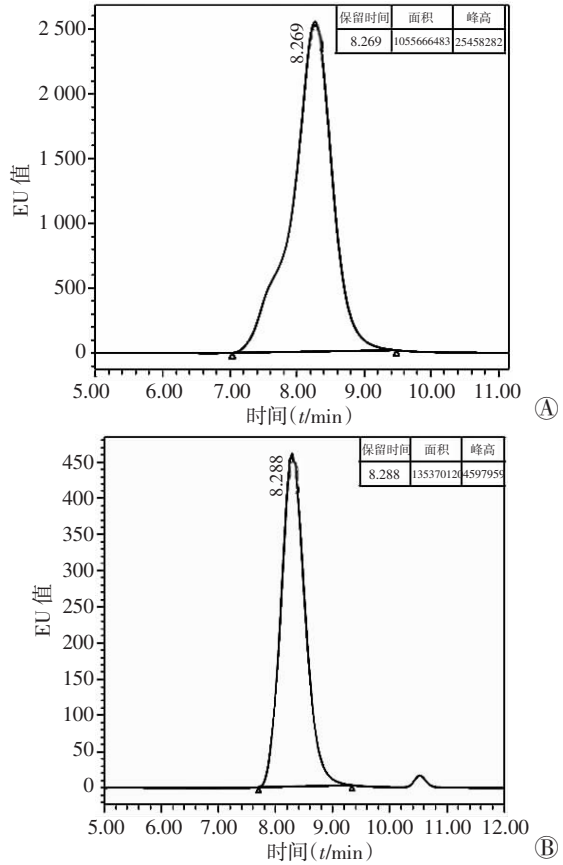
采用 SPSS 18.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间差异比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验(方差齐时)或采用 Tamhane's T2 检验(方差不齐时)。两组间差异比较使用成组 t 检验。

2 结果

2.1 蛋白结合硫酸吲哚酚的鉴定

高效液相色谱法结果显示,不同浓度蛋白结合 IS(4% HSA + IS 100、200、400、800 μmol/L)的蛋白结合率分别为 88.5%,87.2%,90.8% 和 92.15%。与文献

[2]中硫酸吲哚酚蛋白结合率约为90%相符,表明蛋白结合IS制备成功,可用于后续实验。图1为4% HSA+IS 200 μmol/L浓度组的高效液相色谱图。



A:硫酸吲哚酚标准品(IS 200 μmol/L);B:蛋白结合硫酸吲哚酚(4% HSA+IS 200 μmol/L)超滤液

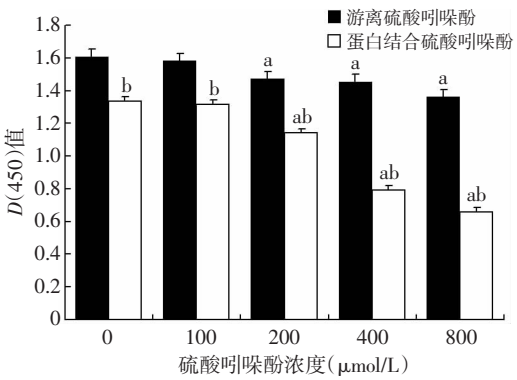
图1 高效液相色谱法检测IS的蛋白结合率

2.2 硫酸吲哚酚对THP-1细胞的增殖抑制作用

CCK-8结果(图2)显示,游离IS组:与对照组比较,200、400、800 μmol/L浓度组细胞增殖出现不同程度抑制($P<0.05$),但这3组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。蛋白结合IS组:与对照组比较,200、400、800 μmol/L浓度组细胞增殖出现不同程度抑制($P<0.05$),且随着药物浓度升高,细胞增殖抑制作用逐渐增强,呈浓度依赖性。同一浓度组间比较,蛋白结合IS对THP-1细胞的增殖抑制作用大于游离组($P<0.05$)。根据CCK8结果,选取200 μmol/L作为后续实验浓度。

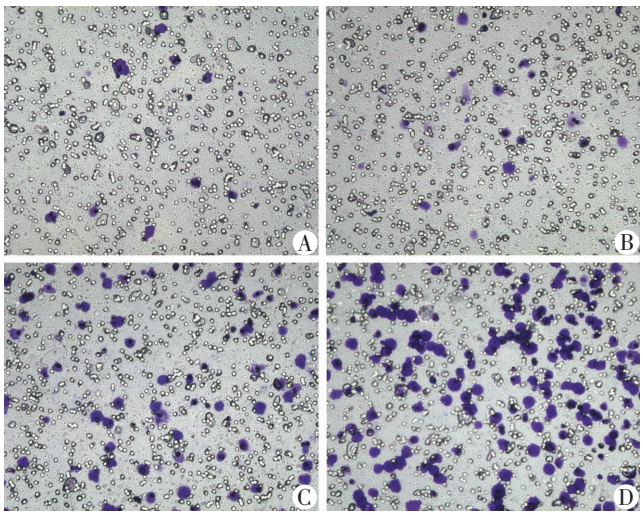
2.3 对THP-1细胞趋化活性的影响

Transwell趋化实验结果(图3)显示,空白对照组(PBS溶液)穿膜细胞数为(14.4±7.5)个/视野;阴性对照组(4% HSA溶液)穿膜细胞数为(14.1±6.4)个/视野;游离IS组(IS 200 μmol/L)穿膜细胞数为(119.9±45.7)个/视野;蛋白结合IS组(4% HSA+IS 200 μmol/L)穿膜细胞数为(78.6±26.4)个/视野。空白对照组和阴性对照组之间差异无统计学意义($P>0.05$);与两对照组比较,游离IS组和蛋白结合IS组趋化细胞数明显增多,且具有统计学差异($P<0.01$);游离IS组趋化细胞数较蛋白结合IS组明显增多,差异有统计学意义($P<0.05$)。说明IS可增强单核细胞的趋化活性,但蛋白结合IS增强单核细胞趋化的作用低于游离IS。



a:$P<0.05$,与0 μmol/L比较;b:$P<0.05$,与游离硫酸吲哚酚比较

图2 硫酸吲哚酚对THP-1细胞的增殖抑制作用



A:空白对照组(PBS);B:阴性对照组(4% HSA);C:蛋白结合硫酸吲哚酚组(4% HSA+IS 200 μmol/L);D:游离IS组(IS 200 μmol/L)

图3 硫酸吲哚酚对THP-1细胞趋化活性的影响
(结晶紫染色 ×200)

2.4 对THP-1细胞分泌MCP-1的影响

ELISA检测结果显示,空白对照组和阴性对照组差异无统计学意义($P>0.05$);与空白对照组比较,游离IS组MCP-1浓度明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与阴性对照组比较,游离IS组和蛋白结

合 IS 组 MCP-1 浓度均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);游离 IS 组 MCP-1 浓度高于蛋白结合 IS 组,但差异无统计学意义。见表 1。

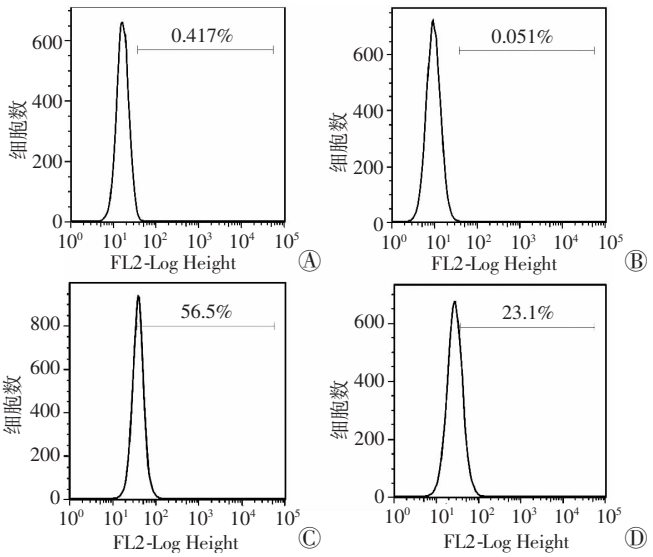
表 1　硫酸吲哚酚对 THP-1 细胞 MCP-1、CCR2 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	MCP-1(pg/mL)	CCR2(%)
空白对照组(PBS)	396.26±45.69	0.20±0.19
阴性对照组(4% HSA)	358.80±38.33	0.13±0.07
游离 IS 组(IS 200 μmol/L)	593.89±133.47^{ab}	54.58±20.13^{ab}
蛋白结合 IS(4% HSA+IS 200 μmol/L)组	475.64±63.35^{b}	21.65±2.17^{abc}

a:$P<0.05$,与空白对照组比较;b:$P<0.05$,与阴性对照组比较;c:$P<0.05$,与游离 IS 组比较

2.5　对 THP-1 细胞表面 CCR2 表达的影响

流式细胞仪检测 THP-1 细胞表面 CCR2 的表达,空白对照组和阴性对照组之间差异无统计学意义;与两对照组比较,游离 IS 组和蛋白结合 IS 组 CCR2 表达明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);游离 IS 组 CCR2 表达阳性率高于蛋白结合 IS 组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 1,图 4。



A:空白对照组(PBS);B:阴性对照组(4% HSA);C:游离 IS 组(IS 200 μmol/L);D:蛋白结合 IS 组(4% HSA+IS 200 μmol/L)

图 4　流式细胞术检测 THP-1 细胞表面 CCR2 的表达

3　讨论

CKD 患者体内 IS 蓄积,其血清浓度较健康人高 43~88 倍[1-2]。循环中 90% 以上的 IS 与血浆白蛋白 Sudlow site Ⅱ位点非共价结合,现有的透析手段难以将其清除[9-10]。既往研究中,多以游离的 IS 进行体外实验,IS 与血浆白蛋白结合后是否仍有毒性尚不清楚。本研究参考欧洲尿毒素研究组(EUTox)建议[1-2],以蛋白结合 IS 进行体外实验,更符合临床实际。

心血管事件和感染是 CKD 患者的主要死因。既往研究表明,IS 可以通过损伤血管内皮细胞、促进血管平滑肌细胞增殖、诱导心肌细胞肥大等增加心血管事件的发生[11-13];通过使 T 细胞亚群分布异常、炎症细胞因子释放失调等增加 CKD 患者的感染风险[5,14]。新近研究发现,IS 可激活单核巨噬系统,使外周血中单核/巨噬细胞向损伤的血管内皮细胞迁移、黏附,促进血管炎症反应及组织因子释放,加速动脉粥样硬化和血栓形成[15-16]。本课题组前期研究也发现,蛋白结合毒素可激活单核细胞,使促炎症细胞因子 TNF-α 释放增加,抑炎症细胞因子 IL-10 释放减少,从而导致炎症状态[17]。前述研究均提示 IS 可通过激活单核巨噬系统增加 CKD 患者心血管事件及其他炎症相关并发症的风险,但其具体机制尚不清楚。因此,本研究通过体外实验观察蛋白结合 IS 和游离 IS 对单核细胞趋化功能的影响,进一步揭示单核/巨噬细胞趋化功能的改变在 CKD 相关并发症中的作用。

既往研究发现,尿毒症患者体内平均 IS 浓度约为 211 μmol/L[1]。本研究参考尿毒症患者体内平均 IS 浓度,以不同浓度的蛋白结合 IS 和游离 IS 进行实验,发现浓度为 200 μmol/L 的蛋白结合 IS 和游离 IS 均可抑制单核细胞增殖,提示 CKD 患者体内 IS 的蓄积可抑制单核细胞增殖,损伤单核细胞功能。同时,本研究发现蛋白结合 IS 对单核细胞的增殖抑制作用具有浓度依赖性,而游离组大于 200 μmol/L 的 3 组间比较差异无统计学意义;且同一浓度的蛋白结合 IS 对单核细胞的增殖抑制作用比游离 IS 更明显。表明蛋白结合 IS 和游离 IS 抑制单核细胞增殖的作用不同,可能为 IS 与白蛋白结合后理化性质改变,抑制细胞增殖毒性增强所致;但需考虑白蛋白是否对单核细胞有抑制作用(蛋白结合组加入 4% HSA 后胶体渗透压改变、实验所用白蛋白来自植物重组等),以及白蛋白所含共轭双键干扰光密度值的检测等因素,其具体原因有待于进一步研究。本研究选取接近尿毒症患者体内平均 IS 浓度的 200 μmol/L 浓度组进行后续实验。

本研究发现 IS 总浓度为 200 μmol/L 的蛋白结合 IS 和游离 IS 均可增强单核细胞的趋化功能,使单核细胞 MCP-1 及 CCR2 的表达上调。提示 CKD 患者体内 IS 蓄积可激活单核细胞,使 MCP-1 表达上调,而 MCP-1 可进一步诱导单核/巨噬细胞趋化和激活单核/巨噬细胞至炎症部位;单核细胞 CCR2 表达的上调,可增强单核细胞的趋化活性,使单核细胞向受损的血管内皮及其他炎症部位迁移。既往研究也发现 MCP-1 与 CCR2

结合后产生的细胞信号通路可促进外周血中单核细胞泡沫化,并向损伤的血管内皮细胞迁移、黏附,使粥样斑块发生炎症反应,加速动脉粥样硬化[8,16],与本研究结果相一致。此外,本研究发现蛋白结合 IS 对单核细胞的趋化作用低于游离 IS,可能是 IS 与白蛋白结合后诱导单核细胞趋化的毒性减小所致。本实验表明,IS 与白蛋白结合后,对单核细胞仍有毒性,说明如果设法解离与白蛋白结合的 IS 并加以清除,可改善尿毒症患者的炎症状态,对降低心脑血管事件及感染等炎症相关并发症的发生有重要意义。

综上所述,蛋白结合 IS 可激活单核细胞,通过上调 MCP-1 及 CCR2 表达增强单核细胞的趋化活性,增加 CKD 患者发生动脉粥样硬化及其他炎症相关并发症的风险;如能清除体内与白蛋白结合的 IS,对于改善 CKD 患者的长期预后,可能有益。

参考文献:

[1] Vanholder R, De-Smet R, Glorieux G, *et al*. Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability[J]. Kidney Int, 2003, 63(5): 1934 - 1943. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2003.00924.x

[2] Duranton F, Cohen G, De-Smet R, *et al*. Normal and pathologic concentrations of uremic toxins [J]. J Am Soc Nephrol, 2012, 23(7): 1258 - 1270. DOI: 10.1681/ASN.2011121175

[3] Ito S, Yoshida M. Protein-bound uremic toxins: new culprits of cardiovascular events in chronic kidney disease patients [J]. Toxins (Basel), 2014, 6(2): 665 - 678. DOI: 10.3390/toxins6020665

[4] Ma Y X, Zhou L, Dong J, *et al*. Arterial stiffness and increased cardiovascular risk in chronic kidney disease[J]. Int Urol Nephrol, 2015, 47(7): 1157 - 1164. DOI: 10.1007/s11255-015-1009-x

[5] Cohen G, Horl W H. Immune Dysfunction in Uremia-An Update[J]. Toxins (Basel), 2012, 4(11): 962 - 990. DOI: 10.3390/toxins4110962

[6] 梁新, 吴军, 韦杏雪, 等. 尿毒症血清蛋白对血管内皮细胞的损伤作用[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(24): 2485 - 2488.

[7] Matsuo K, Yamamoto S, Wakamatsu T, *et al*. Increased proinflammatory cytokine production and decreased cholesterol efflux due to downregulation of ABCG1 in macrophages exposed to indoxyl sulfate[J]. Toxins (Basel), 2015, 7(8): 3155 - 3166. DOI: 10.3390/toxins7083155

[8] Trojanowicz B, Ulrich C, Seibert E, *et al*. Uremic conditions drive human monocytes to pro-atherogenic differentiation via an angiotensin-dependent mechanism [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e102137. DOI: 10.1371/journal.pone.0102137

[9] Vaholder R, Schepers E, Pletinck A, *et al*. An update on protein-bound uremic retention solutes [J]. J Ren Nutr, 2012, 22(1): 90 - 94. DOI: 10.1053/j.jrn.2011.10.026

[10] Watanabe H, Noguchi T, Miyamoto Y, *et al*. Interaction between two sulfate-conjugated uremic toxins, p-cresyl sulfate and indoxyl sulfate, during binding with human serum albumin[J]. Drug Metab Dispos, 2012, 40(7): 1423 - 1428. DOI: 10.1124/dmd.112.045617

[11] Yu M, Kim Y J, Kang D H. Indoxyl sulfate-induced endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease via an induction of oxidative stress [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2011, 6(1): 30 - 39. DOI: 10.2215/CJN.05340610

[12] Mozar A, Louvet L, Morliere P, *et al*. Uremic toxin indoxyl sulfate inhibits human vascular smooth muscle cell proliferation[J]. Ther Apher Dial, 2011, 15(2): 135 - 139. DOI: 10.1111/j.1744-9987.2010.00885.x

[13] Cerasola G, Nardi E, Palermo A, *et al*. Epidemiology and pathophysiology of left ventricular abnormalities in chronic kidney disease: a review [J]. J Nephrol, 2011, 24(1): 1 - 10. DOI: 10.5301/JN.2010.2030

[14] Meijers R W, Betjes M G, Baan C C, *et al*. T-cell ageing in end-stage renal disease patients: Assessment and clinical relevance[J]. World J Nephrol, 2014, 3(4): 268 - 276. DOI: 10.5527/wjn.v3.i4.268

[15] Capasso R, Sambri I, Cimmino A, *et al*. Homocysteinylated albumin promotes increased monocyte-endothelial cell adhesion and up-regulation of MCP1, Hsp60 and ADAM17[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e31388. DOI: 10.1371/journal.pone.0031388

[16] Akdogan M F, Azak A, Denizli N, *et al*. MCP-1 and soluble TWEAK levels are independently associated with coronary artery disease severity in patients with chronic kidney disease[J]. Ren Fail, 2015, 37(8): 1297 - 1302. DOI: 10.3109/0886022X.2015.1065428

[17] 丁瑜, 王建, 梁新, 等. 尿毒症毒素对甲酚对单核细胞体外释放炎症因子的影响[J]. 解放军医学杂志, 2015, 40(1): 35 - 39. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2015.01.08

(**收稿**:2015-10-14;**修回**:2016-01-08)

(编辑 龙 亮)