基础研究 文章编号：0253-3626(2009)06-0706-03

粒－巨细胞集落刺激因子对单核细胞表达 CCR2 的影响

李 炯，罗文军，陈以宽
（重庆医科大学附属第二医院血管外科，重庆 400010）

【摘 要】目的：探讨粒－巨细胞集落刺激因子（Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor，GM-CSF）对体外培养的人单核细胞株 THP-1 表达半胱氨酸－半胱氨酸趋化因子受体 2（Cysteine-cysteine chemokine receptor 2，CCR2）mRNA 和蛋白的影响。方法：以不同浓度的 GM-CSF 处理 THP-1 细胞，应用半定量 RT-PCR 方法检测 CCR2 mRNA 表达，并应用 Western 蛋白印迹法进一步检测 CCR2 蛋白的表达。结果：对照组 THP-1 细胞表达较低水平的 CCR2 mRNA 和蛋白，经 GM-CSF 刺激后各实验组 CCR2 mRNA 和蛋白表达随 GM-CSF 浓度和时间的增加而增强。结论：GM-CSF 可以刺激 THP-1 细胞 CCR2 mRNA 和蛋白的表达，且其增加程度与 GM-CSF 刺激浓度及刺激时间呈正性相关。

【关键词】粒－巨细胞集落刺激因子；单核细胞；CC 趋化因子受体 2
【中国图书分类法分类号】R654.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-02

Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the expression of cysteine-cysteine chemokine receptor 2 in THP-1 monocytes

LI Jiong, et al
(*Department of Vascular Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on expressions of CC chemokine receptor 2 (CCR2) mRNA and protein in cultured human THP-1 cell lines. *Methods*: THP-1 cell was stimulated by GM-CSF of different concentrations and time intervals. The mRNA expression of CCR2 was tested by RT-PCR, The protein expression of CCR2 was analyzed by Western blotting. *Results*: RT-PCR and Western blotting showed that THP-1 cell in control group expressed a low-level of CCR2 mRNA and protein. After stimulated by GM-CSF, the expression of CCR2 mRNA and protein increased in a concentration- and time-dependent manner. *Conclusion*: GM-CSF could stimulate THP-1 cell to express CCR2 mRNA and protein, in an concentration- and time-dependent manner.

【Key words】Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; Monocytes; Cysteine-cysteine chemokine receptor 2

静脉血栓包括深静脉血栓形成和肺栓塞，是血管外科常见的疾病。目前国内外静脉血栓的治疗策略主要是溶栓、抗凝和祛聚等非手术措施。这些治疗措施存在诱发严重出血等危险。体内静脉血栓的吸收和溶解最终主要依靠机体自身的慢性自然溶解机制。目前研究发现，单核－巨噬细胞在静脉血栓的溶解和吸收中有着重要的作用。静脉血栓中注入单核－巨噬细胞可以促进其溶解[1]。在人和动物的血栓中均发现，血栓中的新生血管主要出现在单核－巨噬细胞聚集的区域[2]。先前的研究已经揭示，趋化因子及其受体在深静脉血栓溶解方面扮演着重要的角色。单核细胞趋化蛋白－1（Monocyte chemoattractant protein-1，MCP-1）与其高亲和力半胱氨酸－半胱氨酸趋化因子受体 2（Cysteine-cysteing chemokine receport 2，CCR2）是单核－巨噬细胞的主要趋化因子和受体，它们一起参与体内的多种生理病理过程。在实验模型中发现，加入外源性的 MCP-1（一种 CC 类趋化因子）能促进血栓的溶解[3]。CCR2 基因缺失或 CCR 封闭均能抑制单核细胞的骨髓动员和血栓的溶解[1]。因而深入研究 MCP-1 及其受体 CCR2 的作用机制，有可能为静脉血栓疾病的治疗找到一条新的途径。我们在本实验中旨在探讨粒－巨细胞集落刺激因子（Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor，GM-CSF）对体外培养的人单核细胞株 THP-1 表达 CCR2 mRNA 和蛋白的影响，并进一步探讨 GM-CSF 在静脉血栓溶解中的作用机制。

作者介绍：李 炯（1981- ），男，硕士，
研究方向：血栓性疾病。
通讯作者：罗文军，男，教授，E-mail:Luowenjun516@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 人单核 THP-1 细胞株 由重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室提供。

1.1.2 主要试剂 GM-CSF 购自北京北医联合药业有限公司；RPMI1640 购自 Gibco 公司；胎牛血清购自 Cell Sciences 公司；RNA 提取试剂盒购自上海华舜公司；RT-PCR 试剂盒购自大连 Takara 公司；CCR2 基因及内参 GAPDH 引物由上海生工合成；BCA 检测试剂盒购自上海生工；PVDF 膜购自 Whatman 公司；显影液和定影液购自北京普利莱公司；化学发光试剂购自 ShineGene 公司；兔抗人 CCR2 抗体（一抗）购自武汉博士德公司；辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG（二抗）和内参 GAPDH 一抗均购自北京博奥森公司，其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 THP-1 细胞的培养 THP-1 细胞为悬浮细胞，细胞培养基采用 RPMI1640 完全培养基（含 10%胎牛血清、谷氨酰胺 2 mmol/L、HEPES10 mmol/L、丙酮酸钠 1.0 mmol/L、5×10^{-5} mol/L β-巯基乙醇、青霉素 1.0×10^{5} U/L、链霉素 100 mg/L），在 37℃、5%CO_2 饱和湿度条件下常规培养，每 2~3 d 传代 1 次，待细胞密度达到 1×10^{7} 个 /ml 时用于实验。生长良好的细胞随机分成实验组和对照组，每组细胞数相同。不同浓度实验组分别加入含 GM-CSF40 ng/ml、80 ng/ml、160 ng/ml 的培养基培养 24 h；不同时间实验组加入含 80 ng/mGM-CSF 的培养基，分别培养 12、24、36、48 h；对照组加不含 GM-CSF 的培养基。按不同实验方法，分别收集和保存实验材料。

1.2.2 逆转录多聚酶链反应（RT-PCR） 各组细胞总 RNA 的提取按 RNA 提取试剂盒操作说明进行，取 1 μg 总 RNA 进行逆转录反应，之后以 50 μl 反应体系进行 PCR 扩增。CCR2 基因的引物序列为：正向引物 5'-ACTCCTGCCTCCGCTCTA-3'，反向引物 5'-CGCCAAAATAACCGATGT-3'，PCR 扩增产物长度为 251 bp。反应条件如下：94℃变性 1 min，51℃退火 30 s，72℃延伸 2 min，共 30 个循环，末次延伸为 72℃10 min，4℃保存。内参 GAPDH 的引物序列为：正向引物 5'-CTACCACCTCGAACTTTGACAGC-3'，反向引物 5'-CTTCCCATCCTTGAACAAATACAG-3'，PCR 扩增产物长度为 495bp。反应条件如下：94℃变性 1 min，58℃退火 45 s，72℃延伸 1 min，共 35 个循环，末次延伸为 72℃10 min，4℃保存。反应完毕，取反应产物 10 μl 于 2.0%琼脂糖凝胶中进行电泳，用 Goldview 进行染色，并于紫外灯下拍照，图像分析系统检测各组目的基因及 GAPDH 的积分吸光度（A）值，计算二者的比值，以此作为各组 mRNA 的相对表达量。

1.2.3 Western blot 检测 CCR2 蛋白表达 收集 THP-1 细胞，用裂解液提取蛋白，以蛋白提取液样品做 SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜，取出膜用 TBST 清洗 1 min，4℃冰箱封闭过夜。用封闭液将对应的一抗稀释成一定比例（CCR2 1:400），内参一抗稀释比例为 1:400，温育 1.5 h，TBST 清洗 3 次，每次 10 min。用封闭液将辣根过氧化物酶标记的二抗稀释成一定的浓度（1:4000），温育 2 h，TBST 清洗 3 次，每次 10 min。将化学发光试剂 A 和 B 在保鲜膜上等体积混合，然后加在 PVDF 膜的正面，温育 3 min。进入暗室，将胶片压在 PVDF 膜上，依照发光的强度选择不同的曝光时间。将胶片放入显影液中，出现条带后，立即放入定影液中。对胶片进行扫描，然后用 UVP 凝胶成像系统分析目标蛋白条带的灰度值。

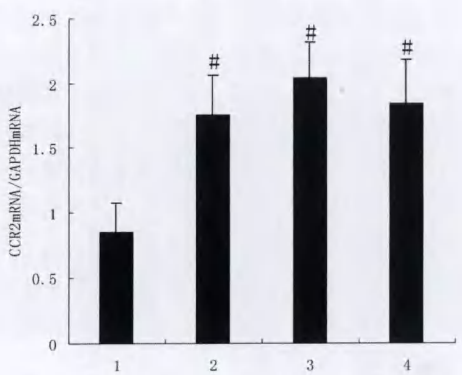
1.2.4 统计学分析 采用 SPSS11.5 统计软件对数据资料进行统计分析。$P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结 果

2.1 RT-PCR 检测结果

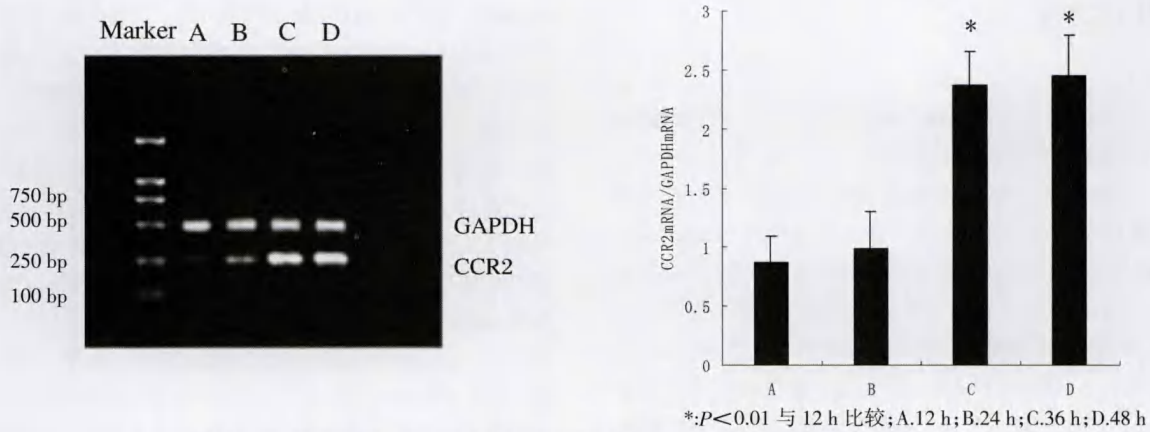
实验组和对照组 THP-1 单核细胞的 CCR2 mRNA 经逆转录并扩增后，电泳显示不同的荧光强度。实验组荧光强度高于对照组。图像分析结果显示：40 ng/ml、80 ng/ml 和 160 ng/ml GM-CSF 3 个浓度组的 CCR2 mRNA 表达水平（A 值分别为 1.75、2.04 和 1.83）均较对照组（A 值为 0.85）明显升高，分别为对照组的 2.23 倍、2.56 倍和 2.29 倍。80ng/ml GM-CSF 处理 THP-1 细胞后，12、24、36 和 48 h 后CCR2 mRNA 表达水





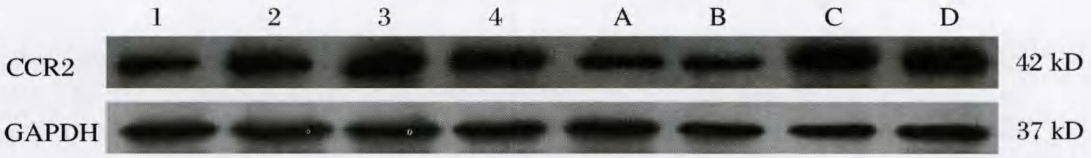
#:$P<0.01$ 与对照组比较；1 对照组；2 GM-CSF 40 ng/ml；3.GM-CSF 80 ng/ml；4 GM-CSF 160 ng/ml

图 1 不同浓度 GM-CSF 对 THP-1 单核细胞表达 CCR2 mRNA 的影响



*:$P<0.01$ 与 12 h 比较；A.12 h；B.24 h；C.36 h；D.48 h

图 2 不同时间 GM-CSF 对 THP-1 单核细胞表达 CCR2 mRNA 的影响



1.对照组；2.GM-CSF 40 ng/ml；3.GM-CSF 80 ng/ml；4.GM-CSF 160 ng/ml；A.12 h；B.24 h；C.36 h；D.48 h

图 3 GM-CSF 对 THP-1 单核细胞表达 CCR2 蛋白的影响

平随时间递增而升高（A 值分别为 0.88、0.99、2.37 和 2.44），在 36 h 后表达稳定增加。

2.2 Western blot 检测结果

不同浓度的 GM-CSF 对 THP-1 单核细胞的 CCR2 蛋白表达的影响不同。图像分析结果显示：40 ng/ml、80 ng/ml 和 160 ng/ml GM-CSF 3 个浓度组的 CCR2 蛋白表达水平（A 值分别为 1.76、2.07 和1.80）均较对照组（A 值为 0.83）明显升高，分别为对照组的 2.12 倍、2.49 倍和 2.17 倍。80 ng/mlGM-CSF 处理 THP-1 细胞后，12、24、36 和 48 h 后 CCR2 基因蛋白表达水平随时间递增而升高（A 值分别为 0.85、0.98、2.34 和 2.41），在 36 h 后表达稳定增加。

3 讨 论

深静脉血栓形成是临床常见的血管外科疾病，发病率在过去 20 年呈上升趋势。预防性抗凝治疗是临床有效的治疗措施，但长期应用可能会带来严重出血危险。直接溶栓治疗因其有限的临床效果而没有建立起标准的治疗策略。深静脉血栓形成后常激发静脉壁和静脉周围组织的炎症反应，单核细胞和巨噬细胞等炎性细胞参与其中。深静脉血栓的溶解是一个十分复杂的过程，包括纤维蛋白溶酶介导的纤维蛋白溶解和蛋白水解酶介导的胶质崩解等。早期的研究已经揭示细胞趋化因子及其受体在深静脉血栓的溶解吸收过程中起着极其重要的作用。它们之间构成特殊的信号通路，共同完成一系列的生理病理过程。

趋化因子受体 CCR2 主要表达在单核－巨噬细胞和少数记忆性 T 淋巴细胞，MCP-1 是 CCR2 的主要配体[4]。MCP-1/CCR2 信号通路在趋化单核－巨噬细胞的迁移和游走中起着重要作用，CCR2 基因敲除小鼠的单核细胞很难由骨髓动员入外周血和到达病变部位[5,6]。Tsou 等人研究发现 CCR2 在趋化单核－巨噬细胞的迁移、游走及动员中起着关键的作用[7]。相似的，单核细胞表达的 CXCR2（另外一种 CC 类趋化因子受体）通过增加纤维蛋白的溶解，在早期血栓溶解过程中也起着重要的作用[8]。Phillips 等人研究显示，人单核细胞和单核细胞株 THP-1 均高表达 CCR2，但 THP-1 分化和发育为成熟的巨噬细胞后检测不到 CCR2 mRNA 和蛋白，表明 CCR2 的表达与单核细胞的成熟密切相关[9]。CCR2 受体还能够通过 Th1-Th2 轴来调节细胞因子的免疫反应，Peter 等人研究证实 CCR2 基因敲除将会导致 Th1 淋巴因子反应的丧失，影响 MMP-9 的活性进而影响深静脉血栓的溶解[10]。深静脉血栓形成后血流的再通包括新生血管的形成，血栓的收缩以及纤维蛋白的溶解等。CCR2 信号通路即参与了新生血管生成的过程[11]。因此，CCR2 的诸多作用为其在血管疾病的治疗新靶点方面提供了很好的研究方向。

目前临床上利用细胞因子来增强目的基因的表达从而达到治疗某些疾病的目的成为研究的热点。GM-CSF 作为临床常用的细胞因子，可以动员骨髓中各种干细胞进入外周血，包括单核细胞，巨噬细胞等炎性细胞。这些细胞到达静脉血栓内部，发挥吞噬作用。同时，GM-CSF 还能促进这些细胞表达更多的趋化因子及其受体，增强其迁移、聚集等能力，加速静脉血栓的溶解、机化和再通。本实验即利用 GM-CSF 的骨髓动员作用，来增加 THP-1 单核细胞 CCR2 基因的表达，促进静脉血栓的溶解。

本实验通过 RT-PCR 和 Western blot 的方法，证实 GM-CSF 在体外可促进 THP-1 单核细胞表达 CCR2 mRNA 和蛋白，且这种效应呈剂量和时间依赖性。不同浓度刺激条件下，以 80

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)06-0709-03

化疗药物联合 TRAIL 对鼻咽癌细胞株增殖抑制的实验研究

余晓燕,邓 碧,沈 娜,叶 琳,张潜英,陈鸿雁
(重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF related apoptosis indncing ligmard,TRAIL)联合化疗药物顺铂(Cisplatin,DDP)、5 氟尿嘧啶(5-Fluorouracil,5-FU)作用于鼻咽癌 HNE-1 细胞株后对其细胞毒作用及凋亡影响的研究。方法:MTT 法检测其增殖抑制率,FCM 法检测细胞凋亡率。结果:TRAIL 与 DDP、5-FU 联合作用于 HNE-1 细胞株时,其抑制率、凋亡率高于单独作用时的抑制率和凋亡率。结论:TRAIL 与 5-FU、DDP 联合作用有协同抑制 HNE-1 细胞株增殖、诱导 HNE-1 细胞株凋亡的作用。

【关键词】TRAIL;DDP;5-FU;HNE-1 细胞株
【中国图书分类法分类号】R739.6 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-06-05

Effects of Trail combined with chenotherapeutics on proliferation and apoptosis of HNE-1 cell line

YU Xiao-yan, et al
(*Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To observe the effects of different concentrations of TRAIL and chemotherapeutic drugs(5-FU, DDP) on proliferation and apoptosis of HNE-1 cell lines ,both singlely and jointly. *Methods*:MTT was used to detect the inhibition rate. FCM was used to detect the apoptosis rate of cell. *Results*:The inhibition rate and apoptosis rate of combination use of TRAIL and 5-FU, DDP

作者介绍:余晓燕(1981-),女,硕士,
研究方向:头颈部肿瘤。
通讯作者:陈鸿雁,女,教授,E-mail:cchhyy787@sohu.com。
基金项目:重庆市卫生局资助(项目编号:07-1-021)。

ng/ml GM-CSF 刺激时,CCR2 mRNA 和蛋白含量表达最高。而不同时间刺激条件下,经过 36 h 刺激后,CCR2 mRNA 和蛋白表达趋于稳定,与对照组相比有明显升高。但是 GM-CSF 如何诱导 THP-1 细胞 CCR2 mRNA 和蛋白表达的机制尚不清楚。该作用在人体外周血单核细胞能否显现,尚需进一步实验加以证实。CCR2 受体的激活可能与以下几种途径有关:直接抑制腺苷酸环化酶活性,减少细胞内 cAMP 水平;活化磷脂酶 C 和蛋白激酶 C,引起胞质中 Ca^{2+} 水平升高;活化 JAK/STAT 途径等。详细的机制还需要进一步的研究。总之,利用细胞因子来促进血栓的溶解可能成为今后静脉血栓性疾病治疗的一个重要发展方向。

参 考 文 献

[1] Ali T, Humphries J, Burnand K, et al. Monocyte recruitment in venous thrombus resolution [J]. Vasc Surg, 2006, 43(3):601-608.
[2] McGuinness C L, Humphries J, Waltham M, et al. Recruitment of labelled monocyte by experimental venous thrombi[J]. Thromb Haemost, 2001, 85(6):1018-1024.
[3] Humphries J, McGuinness C L, Smith A, et al. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) accelerates theorganization and resolution of venous thrombi[J]. Vasc. Surg, 1999, 30: 894 - 899.
[4] Lu D, Yuan X J, Evans R J J, et al. Cloning and functional characterization of the rabbit C-C chemokine receptor 2[J]. BMC Immunol, 2005, 6:15.
[5] Serbina N V, Pamer E G. Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine recepetor CCR2[J]. Nat Immunol, 2006, 7(3):311-317.
[6] Okuma T, Terasaki Y, Kaidita K, et al. C-C chemokine receptor2 (CCR2) deficiency improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis by attenua tion of both macrophage infiltration and production of macrophage-derived matrix metalloproteinases[J]. J Pathol, 2004, 204:594-604.
[7] Tsou C L, Peters W, Si Y, et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites[J]. J Clin Invest, 2007, 117(4):902-909.
[8] Henke P K, Varga A, De S, et al. Deep vein thrombosis resolution is modulated by monocyte CXCR2-mediated activity in a mouse model[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(6):1130-1137.
[9] Phillips R J, Lutz M, Premack B, et al. Differential signaling mechanisms regulate expression of CC chemokine receptor 2 during monocyte maturation[J]. J Inflamm (Lond), 2005, 2:14.
[10] Henke P K, Pearce C G, Moaveni D M, et al. Targeted deletion of CCR2 imp airs deep vein thombosis resolution in a mouse model[J]. J Immunol, 2006, 177(5): 3388-3397.
[11] Charo I F, Taubman M B. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease [J]. J Circ. Res, 2004, 95:858-866.

(责任编辑:冉明会)