

巨噬细胞炎症蛋白 1 α 促进 6T-CEM 细胞穿过人脑微血管内皮细胞单层

尚德淑 马怡然 赵伟东 方文刚 朱 莉 陈誉华* 宋今丹

(中国医科大学基础医学院, 发育生物学教研室, 卫生部细胞生物学重点实验室, 沈阳 110001)

摘要 有研究表明, T 细胞可能参与阿尔茨海默氏病(AD)免疫过程, 但 T 细胞如何穿过血脑屏障内皮细胞紧密连接, 到达脑内还不清楚。我们研究曾发现, AD 病人外周血 T 淋巴细胞穿过人脑微血管内皮细胞(HBMEC)单层能力高于同龄正常人, 其 T 淋巴细胞巨噬细胞炎症蛋白 1 α (MIP-1 α)表达明显增高。为进一步在体外研究促使 T 淋巴细胞穿过 HBMEC 单层的机制, 选取重组人 MIP-1 α (rhMIP-1 α)作用于 HBMEC, 同时选用高表达 MIP-1 α 的人急性白血病 T 淋巴细胞(6T-CEM)作为模式细胞, 与 HBMEC 共同温育。发现 rhMIP-1 α 可促进 6T-CEM 细胞穿过 HBMEC 单层, 并使 HBMEC 单层紧密连接结构发生改变。在 6T-CEM 细胞或 rhMIP-1 α 与 HBMEC 单层单独温育过程中, 均引起 HBMEC 单层 CCR5 表达变化。提示 MIP-1 α 可能通过与 HBMEC 单层上 CCR5 相互作用介导 T 淋巴细胞穿过 HBMEC 单层。

关键词 巨噬细胞炎症蛋白 1 α ; 人脑微血管内皮细胞; 紧密连接蛋白 ZO-1; CC 趋化因子受体 5

阿尔茨海默氏病(AD)是一种与衰老相关的脑退行性疾病, 其特征为病人大脑出现淀粉样 β 蛋白(A β)聚集, 并在脑负责认知功能的区域形成神经元缠结^[1]。这种细胞外的纤维沉积和 A β 成形斑块导致了扩散状斑块的形成, 从而引发炎症反应, 产生神经毒性^[2]。近来研究表明免疫系统具有产生抗 A β 抗体的能力, 促使从脑中清除 A β ^[3-5]。另外, 脑内高度聚集的 A β 沉积可以活化小胶质细胞引起先天性免疫应答^[6], T 细胞可能参与了由活化的小胶质细胞引起的 AD 免疫过程^[7,8]。而 Togo 等^[7]也曾发现 AD 病人脑内 T 细胞水平高于非 AD 退行性痴呆病人和同龄正常对照人群。但外周血 T 细胞到底如何穿过血脑屏障, 到达脑内 A β 沉积部位还不清楚。

血脑屏障是由脑微血管内皮细胞及其间形成的紧密连接、血管基膜和星形胶质细胞的足突构成。我们研究曾发现, AD 病人外周血 T 淋巴细胞穿过由本室自行构建的体外血脑屏障模型——人脑微血管内皮细胞(human brain microvascular endothelial cell, HBMEC)单层能力高于同龄正常人^[9], 表达谱芯片分析结果表明其巨噬细胞炎症蛋白 1 α (macrophage inflammatory protein-1 α , MIP-1 α)表达明显增高。然而, 是否 MIP-1 α 在 T 淋巴细胞穿过 HBMEC 单

层过程中发挥作用, 还未见文献报道。为进一步在体外研究 T 淋巴细胞穿过 HBMEC 单层的机制, 我们选取重组人 MIP-1 α (rhMIP-1 α)作用于 HBMEC, 同时选用高表达 MIP-1 α 的人急性白血病 T 淋巴细胞(6T-CEM)作为模式细胞, 与 HBMEC 单层共温育, 发现 MIP-1 α 可以促进 6T-CEM 细胞穿过 HBMEC 单层, 同时引起 HBMEC 上 CC 趋化因子受体 5(CC chemokine receptor 5, CCR5)表达。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 6T-CEM 细胞(人 T 淋巴细胞白血病细胞株)购自中国科学院细胞库。HBMEC(人脑微血管内皮细胞系)由美国南加州大学医学院 K.S. Kim 博士惠赠。

1.1.2 主要试剂及耗材 Transwell (Corning-Costar 公司), rhMIP-1 α 和抗人 MIP-1 α 抗体(93321, R&D System 公司), 辣根过氧化物酶(HRP)和邻苯二胺

收稿日期: 2006-04-04 接受日期: 2006-06-29

教育部跨世纪人才基金资助项目(教技函[2002] 48 号), 博士点基金(No.20040159002)

* 通讯作者。Tel: 024-23260246, E-mail: yhchen@mail.cmu.edu.cn

(Sigma 公司), FITC 标记小鼠抗人 ZO-1 单抗(33-9111, Zymed), CCR5 兔抗人多克隆抗体(sc-13958), HRP 偶联的羊抗兔 IgG (sc-2301)和羊抗鼠 IgG (sc-3697)均为 Santa Cruz 公司产品, 胎牛血清(Hyclone 公司), Nu 血清购自 BD Biosciences 公司, 其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HBMEC 培养于含 10% 胎牛血清, 10% Nu 血清的 RPMI 1640 培养液。6T-CEM 细胞培养于 10% 新生牛血清的 DMEM 培养液, 所有细胞置于 37 °C, 5% CO₂, 100% 湿度的细胞培养箱中培养, 每 2~3 天更换新鲜培养液。

1.2.2 免疫荧光法观察紧密连接蛋白 ZO-1 分布 将 HBMEC 以适当密度接种在无菌处理的盖片上, 待细胞融合成单层, 加入 6T-CEM 细胞温育 2、8 和 20 h, 用 4% 甲醛溶液固定 20 min, 0.2% Triton-X 100 透化 10 min, 3% BSA 封闭 1 h 后, 与 FITC 标记小鼠抗人 ZO-1 室温温育 2 h, 95% 甘油封片, Olympus BX 51 荧光显微镜观察, 用数码相机进行图像采集。

1.2.3 6T-CEM 细胞穿过 HBMEC 单层能力分析 在放置在 24 孔板中的 Transwell 上室以 2×10^5 个/孔密度接种 HBMEC, 每 2 天换一次培养液。待细胞长至第 4 天, 换新鲜培养液, 同时所有 Transwell 上室中加入 6T-CEM 细胞, 在其中 4 组 Transwell 上室中分别加入不同浓度的 rhMIP-1 α (0、0.7813、12.5、50 ng/ml), 作用 20 h; 在另外 5 组 Transwell 上室中分别加入不同浓度(0、1、5、10、20 μ g/ml) 的抗人 MIP-1 α 中和抗体, 温育 20 h。将 Transwell 下室中的液体混匀, 吸取 10 μ l, 加到血球计数板的计数池中, 计数穿过的细胞数。

1.2.4 HBMEC 单层通透性分析 在 Transwell 上室中加入浓度为 2.5 ng/ml rhMIP-1 α , 分别温育 1、2、4、6、8 h, 或者加入不同浓度的 rhMIP-1 α (0、0.25、2.5、12.5、50 ng/ml), 温育 6 h, 测定跨上皮细胞电阻(trans epithelial electrical resistance, TEER)。然后将 Transwell 中的液体换为无血清 RPMI 1640 培养液, 同时加入终浓度为 0.5 μ mol/L HRP, 作用 1.5 h。

(1)TEER 分析 将 Millicell-ERS endothelia volt-ohmmeter(World Precision Instruments Inc.)的电极长端插入 Transwell 下室, 短端插入 Transwell 上室, 读数。

(2)HRP flux 分析 从上述加过 HRP 的 Transwell 下室中取 5 μ l 培养液于酶标板中, 分别加入 195 μ l 新鲜配制的浓度为 400 μ g/ml 邻苯二胺, 溶于 pH 5.0, 含有 0.012% H₂O₂ 的 0.05 mol/L 柠檬酸和 0.1 mol/L 磷酸盐的溶液中。15 min 后加入 50 μ l 0.3 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 于酶标仪上读取 A₄₉₂ 的值。

1.2.5 Western 印迹分析 将生长在对数生长期的 6T-CEM 细胞以 2×10^6 个/瓶密度接种于培养在 25 cm² 克氏瓶中形成单层的 HBMEC 上, 分别温育 0、5、10、20 h, PBS 洗去 6T-CEM 细胞; 在以 rhMIP-1 α 刺激 HBMEC 单层的实验中, 将不同浓度的 rhMIP-1 α (0、0.0025、0.25、2.5 ng/ml) 加在 HBMEC 单层上, 或者将 2.5 ng/ml rhMIP-1 α 加在 HBMEC 单层上, 温育不同时间(0、1、2、4、8、20 h), 依次用无血清 RPMI 1640 培养液和 PBS 冲洗细胞。收集 HBMEC, 提取蛋白质。上样量为 20 μ g, 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离, 半干转印法转移到 PVDF 膜。脱脂奶粉封闭, 一抗、二抗杂交, ECL 显色。一抗分别为 CCR5 兔抗人多克隆抗体 (43 kDa) 和 GAPDH 鼠抗人单克隆抗体 (36 kDa)。二抗分别为 HRP 偶联的羊抗兔 IgG 和羊抗鼠 IgG。

1.2.6 统计学分析 采用 Excel 软件进行处理, 数据来自 3 次实验的平均值, 以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两组均数的差别通过 *t* 检验进行比较。

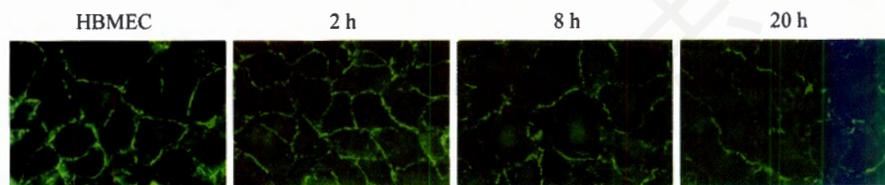
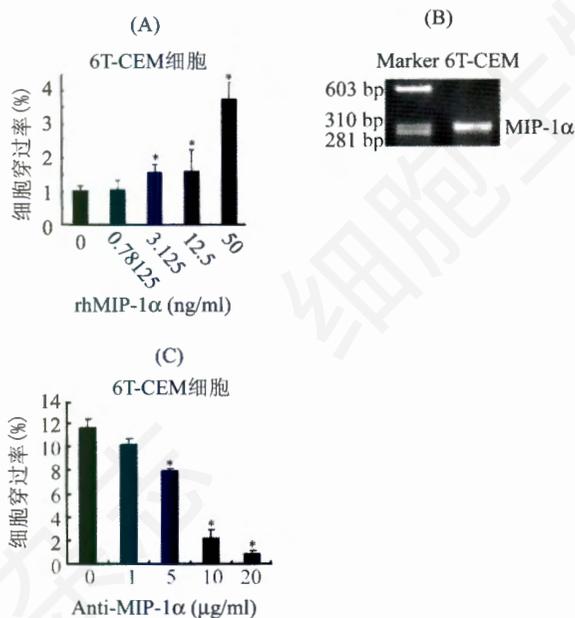
2 结果

2.1 6T-CEM 细胞与 HBMEC 相互作用使 HBMEC 单层紧密连接结构发生改变

6T-CEM 细胞与 HBMEC 单层作用, 在 2 h 的时候, ZO-1 的分布与正常 HBMEC 单层未见差别, 随着时间的增加, 到达 8 h 的时候, HBMEC 单层 ZO-1 的分布由连续变得不连续, 到达 20 h 时, 大多部位看不到 ZO-1 的分布(图 1)。

2.2 rhMIP-1 α 促进 6T-CEM 细胞穿过 HBMEC 单层

rhMIP-1 α 和 6T-CEM 细胞与 HBMEC 单层共同温育, 随着 rhMIP-1 α 浓度增加, 6T-CEM 细胞穿过 HBMEC 单层数量增加(图 2A)。6T-CEM 细胞可以分泌 rhMIP-1 α (图 2B), 当将 6T-CEM 细胞与 HBMEC 单层共同温育 20 h 后, 在 Transwell 下室中可见穿过的 6T-CEM 细胞(结果未显示), 但是抗 MIP-1 α 中和抗体可以阻止这种细胞穿过, 并呈现抗 MIP-1 α 中和抗体浓度依赖性(图 2C)。

图1 6T-CEM 细胞与 HBMEC 温育不同时间 ZO-1 分布变化(200 \times)图2 rhMIP-1 α 和抗 MIP-1 α 中和抗体对 6T-CEM 细胞穿过 HBMEC 单层的影响

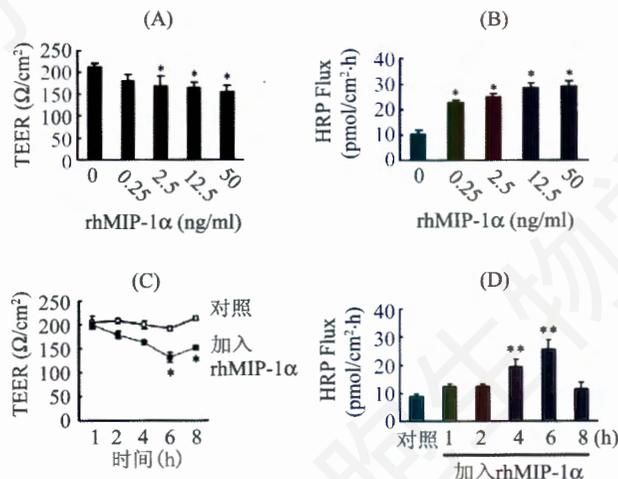
A: 不同浓度 rhMIP-1 α 作用 20 h, 6T-CEM 细胞穿过 HBMEC 单层数增加, 与未加 rhMIP-1 α 的对照组相比, $*P < 0.05$; B: RT-PCR 结果显示 6T-CEM 细胞表达 rhMIP-1 α ; C: 不同浓度抗 MIP-1 α 中和抗体作用 20 h, 可以抑制 6T-CEM 细胞穿过 HBMEC 单层, 与未加抗 MIP-1 α 中和抗体的对照组相比, $*P < 0.05$ 。

2.3 rhMIP-1 α 引起 HBMEC 紧密连接结构改变

在 rhMIP-1 α 作用下, 荧光显微镜观察 HBMEC 单层 ZO-1 分布的改变呈现时间和剂量依赖性(结果未示)。TEER 分析显示随着 rhMIP-1 α 浓度增加, 内皮细胞电阻降低, 在相同浓度 rhMIP-1 α 作用下, 内皮细胞电阻先降低, 到 6 h 达到最低点, 而后开始升高, 表明受到破坏的 HBMEC 单层紧密连接结构得到部分恢复(图 3A)。与 TEER 结果相对应, HRP flux 实验结果显示随着内皮细胞电阻降低, HRP 透过量增加(图 3B)。

2.4 6T-CEM 细胞或 rhMIP-1 α 与 HBMEC 相互作用均引起 CCR5 表达升高

正常 HBMEC 不表达或弱表达 CCR5, 6T-CEM 细胞与 HBMEC 相互作用 5 h 引起 HBMEC 单层上

图3 TEER 分析显示 rhMIP-1 α 引起 HBMEC 单层紧密连接结构破坏

A: 不同浓度 rhMIP-1 α 作用下, HBMEC 单层 TEER 变化, 与未加 rhMIP-1 α 对照组相比, $*P < 0.05$; B: 不同浓度 rhMIP-1 α 作用下, HRP 穿过 HBMEC 单层变化, 与未加 rhMIP-1 α 对照组相比, $*P < 0.05$; C: 相同浓度 rhMIP-1 α , 作用不同时间条件下, HBMEC 单层 TEER 变化, 与同一时间点的对照组相比, $*P < 0.05$; D: 相同浓度 rhMIP-1 α , 作用不同时间条件下, HRP 穿过 HBMEC 单层变化, 与对照组相比, $**P < 0.05$ 。

CCR5 少量表达, CCR5 表达达到 10 h 达到最高, 而后降低(图 4A)。在 rhMIP-1 α 的单独作用下, HBMEC 单层 CCR5 表达呈现 rhMIP-1 α 时间和浓度依赖性(图 4B)。2D7 是 CCR5 特异性遏抗剂, 当将 2D7 和 6T-CEM 细胞与 HBMEC 单层共同温育后, 6T-CEM 细胞穿过数降低(图 4C)。

3 讨论

在正常的生理、免疫病理和宿主抵御外界感染的过程中, T 细胞免疫起着主要的作用。虽然长期以来一直认为中枢神经系统具有免疫豁免性, 但是目前有研究表明激活的 T 细胞能够穿过血脑屏障, 到达中枢神经系统参与免疫反应^[10]。在 AD 的研究中也发现, AD 病人外周血 T 淋巴细胞与同龄对照相比明显增高^[6]。基于此, 我们开展了 AD 病人外周血 T 淋巴细胞与同龄对照基因表达谱芯片研究,

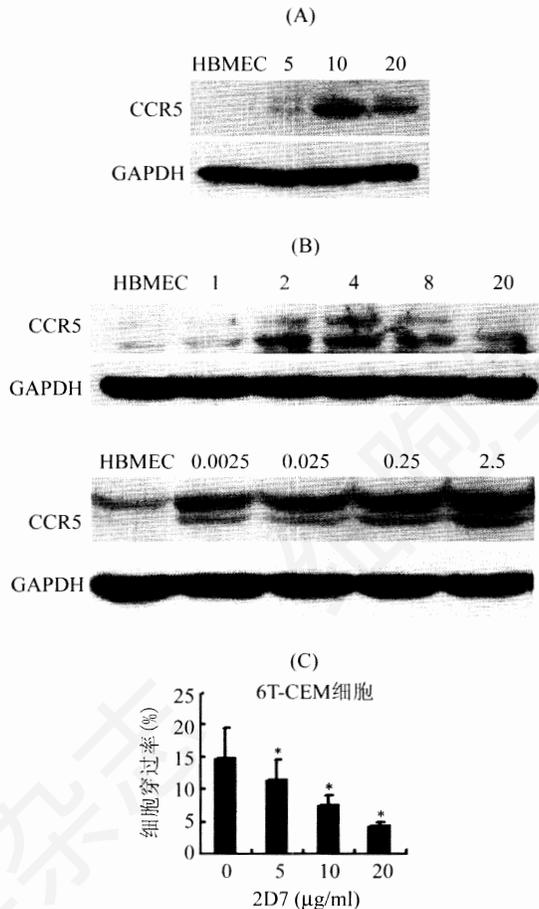


图4 6T-CEM细胞或rhMIP-1 α 与HBMEC相互作用均引起CCR5表达升高

A: 6T-CEM细胞与HBMEC单层相互作用引起HBMEC单层上CCR5表达升高,数字代表6T-CEM细胞与HBMEC温育的时间(h); B: 在rhMIP-1 α 的作用下,HBMEC单层上CCR5的表达呈现对rhMIP-1 α 的时间和浓度依赖性,数字分别代表rhMIP-1 α 作用的时间(h)和浓度(ng/ml); C: CCR5特异性抗体2D7可阻断6T-CEM细胞穿过HBMEC单层,并呈现浓度依赖性,与未加2D7的对照组相比,* $P < 0.05$ 。

结果发现MIP-1 α 表达明显增高。MIP-1 α 是CC趋化因子中的一种^[11],主要由单核细胞、中性粒细胞、小胶质细胞和星形胶质细胞产生^[12-14],它对于趋化白细胞进入组织中的炎症部位具有重要作用,在中枢神经系统炎症过程中广泛表达^[15,16]。但是否MIP-1 α 在T淋巴细胞入脑过程中发挥作用还不清楚。

为了研究MIP-1 α 在T淋巴细胞穿过血脑屏障过程中的作用,我们用rhMIP-1 α 作用于HBMEC,同时选用高表达MIP-1 α 的6T-CEM细胞与HBMEC共同温育。发现rhMIP-1 α 可以引起HBMEC单层紧密连接蛋白ZO-1分布的变化,改变内皮细胞电阻,促使6T-CEM以及本实验中采用的示踪分子HRP穿

过HBMEC单层。这些结果提示MIP-1 α 的作用可能在于它可以直接促使内皮细胞紧密连接开放,帮助T细胞穿过。

MIP-1 α 究竟如何促进T细胞穿过HBMEC紧密连接?目前已知CCR5是7次跨膜的G蛋白偶联受体,在白细胞上表达^[17],炎症部位细胞分泌的MIP-1 α 通过与T细胞上的受体CCR5结合发挥趋化因子的作用,趋化白细胞进入炎症部位。另有文献报道,CCR5也在人脑微血管内皮细胞上低水平表达^[18],MIP-1 α 在脑微血管上有结合位点^[19]。我们研究发现将6T-CEM细胞与HBMEC共同温育,可以引起HBMEC上CCR5的表达,rhMIP-1 α 可以刺激HBMEC单层CCR5表达升高。是否这些结果提示MIP-1 α 可能通过与CCR5结合促使T细胞穿过HBMEC单层?作为CC趋化因子家族的另一个成员——单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1),主要功能是动员单核细胞/巨噬细胞和激活的淋巴细胞进入中枢神经系统。但是近年研究表明,MCP-1可以通过与表达在鼠脑微血管内皮细胞上的CCR2相互作用,增加脑微血管内皮细胞的通透性^[20]。上述研究结果和文献资料提示,MIP-1 α 具有直接开通血脑屏障促使T淋巴细胞穿过的功能,这种跨内皮的迁移可能是通过MIP-1 α 与CCR5相互作用实现的。本研究是在体外对AD病人T淋巴细胞穿过血脑屏障机制的进一步探索,该结果可望为深入了解T细胞入脑机制提供线索,为通过人工手段干预T细胞入脑积累资料。

参考文献 (References)

- [1] Hardy J et al. *Science*, 2002, **297**: 353
- [2] Mattson MP. *Nature*, 2004, **430**: 631
- [3] Schenk D et al. *Nature*, 1999, **400**: 173
- [4] Bard F et al. *Nat Med*, 2000, **6**: 916
- [5] Sigurdsson EM et al. *J Neurosci*, 2004, **24**: 6277
- [6] Monsonego A et al. *Science*, 2003, **302**: 834
- [7] Togo T et al. *J Neuroimmunol*, 2002, **124**: 83
- [8] Townsend KP et al. *Eur J Immunol*, 2005, **35**: 901
- [9] 曼淑梅等. *中国神经精神疾病杂志*, 2004, **30**: 266
- [10] Ransohoff RM et al. *Nat Rev Immunol*, 2003, **3**: 569
- [11] Davatilis G et al. *J Exp Med*, 1988, **167**: 1939
- [12] Wolpe SD et al. *J Exp Med*, 1988, **167**: 570
- [13] Lukacs NW et al. *Am J Pathol*, 1994, **144**: 711
- [14] Smits HA et al. *J Neuroimmunol*, 2002, **127**: 160
- [15] Mennicken F et al. *Trends Pharmacol Sci*, 1999, **20**: 73
- [16] Xia MQ et al. *J Neurovirol*, 1999, **5**: 32
- [17] Mueller A et al. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, **36**: 35
- [18] Berger O et al. *Mol Med*, 1999, **5**: 795
- [19] Andjelkovic AV et al. *J Neurochem*, 2000, **75**: 1898
- [20] Stamatovic SM et al. *J Cell Sci*, 2003, **116**: 4615

Increased Migration of 6T-CEM through Human Brain Microvascular Endothelial Cells Monolayer Dependent on Macrophage Inflammatory Protein-1 α

De-Shu Shang, Yi-Ran Ma, Wei-Dong Zhao, Wen-Gang Fang, Li Zhu, Yu-Hua Chen*, Jin-Dan Song
(Department of Developmental Biology, Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health, the College of Basic Medical Science, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract It has been showed that T lymphocytes might participate in the inflammation process in Alzheimer's disease (AD), however, it is unclear how circulating T cells cross the blood-brain barrier (BBB). We have showed the stronger ability to migrate through human brain microvascular endothelial cells (HBMECs) and a significantly higher macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) expression in peripheral T lymphocytes of AD patients than age-matched healthy subjects. In order to explore the mechanism of the transendothelial migration of T lymphocytes further, rhMIP-1 α or 6T-CEM, the cell line of human lymphoblastic leukemia which highly expressed MIP-1 α , were incubated with HBMEC monolayer separately. It was showed that rhMIP-1 α could enhance the migration of 6T-CEM cells through HBMEC monolayer and disrupt the tight junction of HBMEC. The expressions of CC chemokine receptor 5 (CCR5) on HBMECs which incubated with rhMIP-1 α or 6T-CEM cells were detected. These data suggested that MIP-1 α might promote the transendothelial migration of T lymphocytes by interacting with CCR5 on HBMEC monolayer.

Key words macrophage inflammatory protein-1 α ; human brain microvascular endothelial cell; tight junction protein ZO-1; CC chemokine receptor 5

Received: April 4, 2006 Accepted: June 29, 2006

This work was supported by the Century Talented Man Foundation (JJH[2002] No.48) and Doctor Authorizing Unit Foundation (No. 20040159002), the Ministry of Education of China

*Corresponding author. Tel: 86-24-23260246, E-mail: yhchen@mail.cmu.edu.cn