

镍钛合金支架抑制单核巨噬细胞应答革兰阴性菌脂多糖的研究*

罗海波¹, 吕爱贞², 卢晓², 富宁², 吴砂², 郑华^{3△}
(1. 广州军区解放军第 421 医院检验输血科, 广州 510310; 2. 南方医科大学基础医学院免疫学教研室, 广州 510515; 3. 南方医科大学南方医院心内科, 广州 510515)

摘要:目的 研究镍钛合金心血管支架(NTS)及地塞米松(DX)抗支架过敏治疗对单核巨噬细胞革兰阴性菌脂多糖(LPS)刺激的影响。方法 单核巨噬细胞系 Raw264.7 细胞组与 DX 预处理 Raw264.7 细胞组, NTS 作用 4 d 后, Toll 样受体 4 (TLR4) 激动剂脂多糖(LPS)刺激 24 h, 流式细胞术检测细胞表面标志 CD80、CD86、FasL 等分子表达; ELISA 检测培养液促炎症因子 IL-6、TNF- α ; 特异荧光素酶试剂盒检测 NF- κ B、干扰素- γ 序列(GAS)、干扰素刺激反应元件(ISRE)、信号转导与转录活化因子 3 (STAT3) 细胞炎症因子相关信号通路的活化。结果 镍钛合金作用后, 促进 LPS 介导的 Raw264.7 细胞表达 CD80 分子, 抑制其表达 FasL, 降低 IL-6 分泌, 抑制细胞内 NF- κ B 通路的活化($P<0.05$)。而经过 DX 预处理的 Raw264.7, 镍钛合金促进 Raw264.7 细胞表达 CD80、FasL 分子, 增加 TNF- α 分泌, 抑制胞内炎症信号通路 NF- κ B、ISRE、STAT3 等通路的活化($P<0.05$)。结论 NTS 抑制 Raw264.7 细胞对 TLR4 激动剂 LPS 的免疫应答。

关键词: 地塞米松; 脂多糖类; 镍钛合金支架; 单核巨噬细胞
doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.05.024 文献标识码: A 文章编号: 1671-8348(2014)05-0575-03

Suppressive effect of nickel-titanium stent on macrophage cells reactivity to lipopolysaccharide(LPS) from gram-negative bacterium*
Luo Haibo¹, Lv Aizhen², Lu Xiao², Fu Ning², Wu Sha², Zheng Hua^{3△}

(1. Department of Clinical Laboratory and Blood Transfusion, the 421 Hospital of PLA, Guangzhou, Guangdong 510310, China; 2. Department of Immunology, Basic Medical College of South Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 3. Department of Gardiology, Nanfang Hospital of South Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China)

Abstract: Objective To study the effect of nickel-titanium stent(NTS) and consequent anti-allergy dexamethasone therapy on macrophage cells reactivity to lipopolysaccharide(LPS) from gram-negative bacterium. **Methods** The macrophage cell line Raw 264.7 and dexamethasone-pretreated Raw264.7 were co-cultured with NTS for 4 days, and stimulated with LPS for 24 hours. The surface marker CD molecules of CD80, CD86 and FasL were detected with flowcytometr method, the supernant cytokine production of proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α was valued with ELISA method, and intracellular inflammatory signal pathway activation of NF- κ B, GAS, ISRE and STAT3 was checked with signal molecule specific promoter luciferase analysis. **Results** The stent pre-treatment improved LPS-mediated CD80 expression, suppressed FasL production, decreased IL-6 secretion and NF- κ B activation, the results have statistical significance($P<0.05$). The dexamethasone treatment improved stent-mediated up-regulated expression of CD80, FasL and TNF- α , and suppressed the activation of intracellular inflammatory signal pathway of NF- κ B, ISRE and STAT3, the results have statistical significance($P<0.05$). **Conclusion** NTS inhibit macrophage cells Raw264.7 react to TLR4 agonist LPS, and dexamethasone treatment improved the function.

Key words: dexamethasone; lipopolysaccharides; nickel titanium stent; macrophage cells

心血管狭窄引起的冠心病已经成为危及人类生命健康的主要疾病之一, 向病变血管内置入金属支架, 成为目前治疗冠状动脉及其他外周动脉疾病有效的治疗方法^[1]。目前常用的材料有钽、医用不锈钢及镍钛合金等。近年来发现, 这些金属材料支架会影响单核巨噬细胞功能, 引发过敏反应^[2]。但对单核巨噬细胞其他功能的影响却未做深入研究。

单核巨噬细胞的重要功能之一就是抗感染, 通过多种方式能识别多种病原微生物关键成分, 从而发挥清除病原微生物的目的。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰阴性菌细胞壁的重要组成部分, 对细胞的生长与持续极为重要, 单核巨噬细胞通过其表面 Toll 样受体 4(Toll like receptor 4, TLR4)-LPS 识别革兰阴性菌, 诱发一系列的炎性反应及免疫应答^[3]。本研究利用镍钛合金心血管支架(nickel-titanium stent, NTS)作用单核巨噬细胞系 Raw264.7 细胞, 检查其影响单核巨噬细胞应

答 LPS 的能力及其胞内炎症相关的信号通路改变, 从而探讨 NTS 对单核巨噬细胞抗感染能力, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

PE 标记抗小鼠 FasL、CD80、CD86 抗体均购自美国 Biolegend 公司。小鼠 IL-6、TNF- α 的 ELISA 试剂盒均购自美国 Biolegend 公司。LPS 购自美国 Sigma 公司。Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司。Luciferase Assay 购自美国 Promega 公司。pGL4.32-luc2P/NF- κ B-RE/Hygro Vector 购自美国 Promega 公司。干扰素- γ (GAS)、干扰素刺激反应元件(ISRE)、信号转导与转录活化因子(STAT3)信号通路质粒均购自美国 Clontech 公司。不完全培养基 RPMI-1640 及新生小牛血清均购自美国 Gibco 公司。胰蛋白酶购自广州

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30901341)。 作者简介: 罗海波(1972—), 副主任技师, 博士, 主要从事多肽疫苗研究。 △ 通讯作者, Tel: (020)61641502; E-mail: gzhzmd@fimmu.com。

威佳科技有限公司。NTS 为荷兰 Orbusneich 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 单核巨噬细胞培养 Raw264.7 细胞用含 10% 新生小牛血清的完全培养基 RPMI-1640 在 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养。

1.2.2 地塞米松(DX)刺激 Raw264.7 细胞 于 Raw264.7 细胞中加入 10⁻⁶ mol/L DX 培养 4 d(DX-Raw264.7 细胞)。

1.2.3 NTS 刺激 Raw264.7 细胞及 DX-Raw264.7 细胞 调整细胞密度为 1×10⁶/mL,于培养的 Raw264.7 细胞及 DX-Raw264.7 细胞中加入 NTS 培养 4 d。

1.2.4 LPS 刺激经支架作用后的 Raw264.7 细胞及 DX-Raw264.7 细胞 于经 NTS 作用后的 Raw264.7 细胞及 DX-Raw264.7 细胞中加入 LPS 培养 24 h,收集细胞培养上清液,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 遍待检。

1.2.5 流式细胞仪检测 调整细胞密度为 1×10⁶/mL,分别标记抗体 PE-FasL,PE-CD80。4℃孵育 30 min,PBS 洗 2 遍,加入 0.5 mL PBS 重悬,流式细胞仪进行分析。

1.2.6 细胞因子检测 根据小鼠 IL-6、TNF-α 的 ELISA 试剂盒说明书检测 Raw264.7 细胞及 DX-Raw264.7 细胞培养上清液中 IL-6 和 TNF-α。

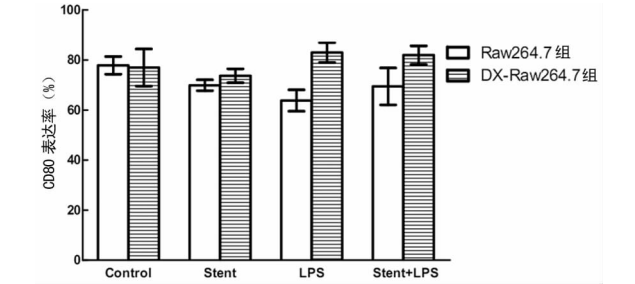
1.2.7 信号通路活化检测 铺板,将每孔的细胞密度调整为 1×10⁵/mL,按 Lipofectamine 2000 说明书将 pGL4.32[luc2P/NF-κB-RE/Hygro] Vector、pTA-GAS-luc、pTA-ISRE-luc 和 pTA-STAT3-luc 信号通路活化质粒转染各组 Raw264.7 细胞及 DX-Raw264.7 细胞,24 h 后收集细胞裂解液,荧光素酶试剂盒进行检测。

1.2.8 根据不同处理方式分组 分为:对照空白组,单纯 NTS 组,单纯 LPS 作用组,NTS 作用后 LPS 反应组,RAW264.7 组;单核细胞系 264.7,DX-Raw264.7 组;DX 作用单核细胞系。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析,所用的统计学方法为 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NTS 作用后 LPS 对 Raw264.7 及 DX-Raw264.7 细胞表面共刺激分子的影响 NTS 作用后经过 LPS 刺激时,Raw264.7 细胞 CD80 的表达明显高于 LPS 单独刺激组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。而 DX 预处理组,NTS 影响差异无统计学意义(*P* > 0.05),见图 1。

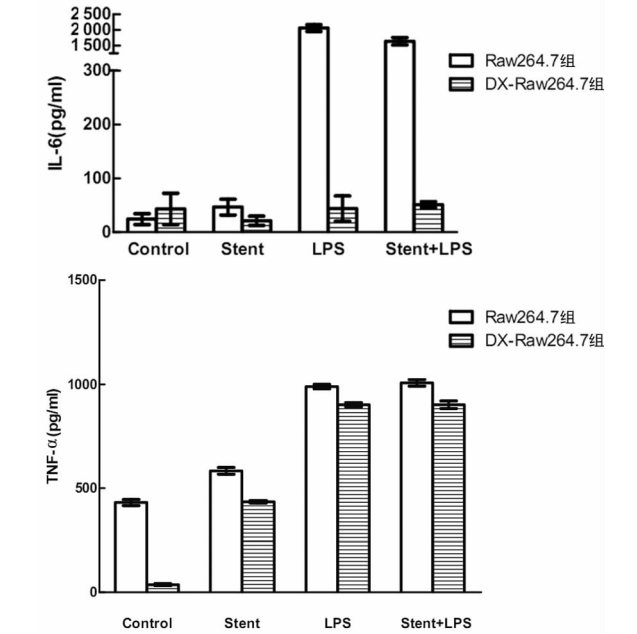


Control:空白对照组;Stent:单纯 NTS 组;LPS:单纯 LPS 作用组;Stent+LPS:NTS 作用后 LPS 反应组。

图 1 NTS 作用后 LPS 对 Raw264.7 及 DX-Raw264.7 细胞表达 CD80 的影响

2.2 NTS 作用后 LPS 对单核巨噬细胞 Raw264.7 合成促炎症因子的影响 在 NTS 单独作用下,Raw264.7 组分泌 IL-6 及 TNF-α 明显高于空白对照组,但经 NTS 作用后,应对 LPS

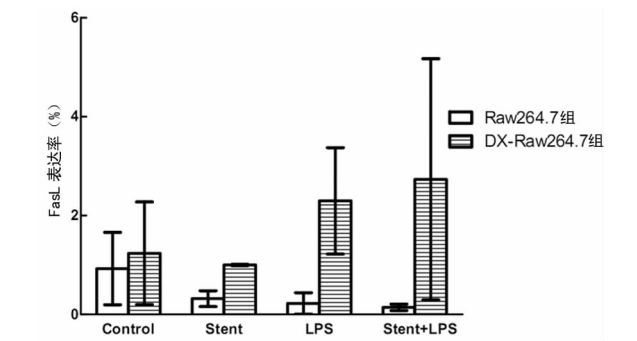
刺激时 Raw264.7 组分泌 IL-6 明显低于 LPS 单独刺激组。但 Raw264.7 组经过 DX 事先处理后,各组 IL-6 的分泌差异无统计学意义(*P* > 0.05),而且 NTS 与 LPS 对单核巨噬细胞的影响都明显受到了抑制,弱于 Raw264.7 组,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见图 2。



Control:空白对照组;Stent:单纯 NTS 组;LPS:单纯 LPS 作用组;Stent+LPS:NTS 作用后 LPS 反应组。

图 2 NTS 作用后 LPS 对 Raw264.7 细胞及 DX-Raw264.7 细胞分泌 IL-6 及 TNF-α 的影响

2.3 NTS 作用后 LPS 对单核巨噬细胞 Raw264.7 细胞表面 FasL 类分子表达的影响 经 NTS 作用后,LPS 诱导的 Raw264.7 细胞 FasL 的表达明显低于 LPS 单独刺激组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。但 Raw264.7 细胞经过 DX 事先处理后,DX-Raw264.7 细胞经 NTS 单独刺激后,FasL 的表达明显低于空白对照组,经 LPS 单独刺激后,FasL 的表达明显高于空白对照组,而低于 NTS 与 LPS 共同刺激组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。在 LPS 单独刺激下,DX-Raw264.7 组表面 FasL 的表达明显高于 Raw264.7 组,在 NTS 与 LPS 共同刺激下,DX-Raw264.7 组表面 FasL 的表达同样明显高于 Raw264.7 组,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见图 3。



Control:空白对照组;Stent:单纯 NTS 组;LPS:单纯 LPS 作用组;Stent+LPS:NTS 作用后 LPS 反应组。

图 3 NTS 作用后 LPS 对 Raw264.7 细胞及 DX-Raw264.7 细胞表达 FasL 的影响

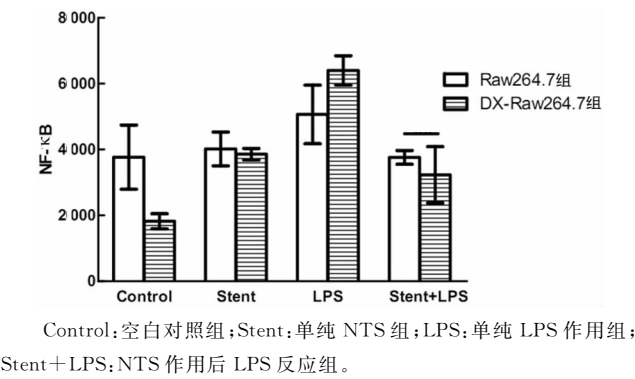


图 4 NTS 作用后 LPS 对 Raw264.7 细胞及 DX-Raw264.7 细胞胞内 NF-κB 信号通路活化的影响

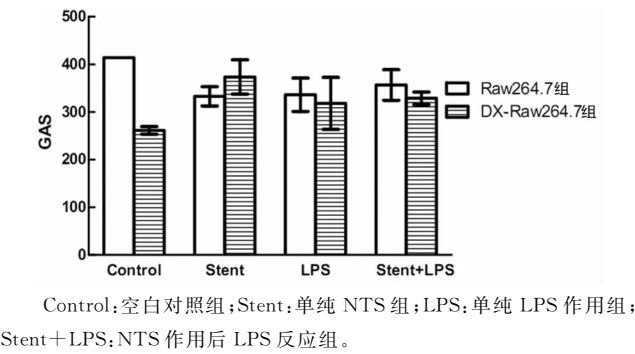


图 5 NTS 作用后 LPS 对 Raw264.7 细胞及 DX-Raw264.7 细胞胞内 GAS 信号通路活化的影响

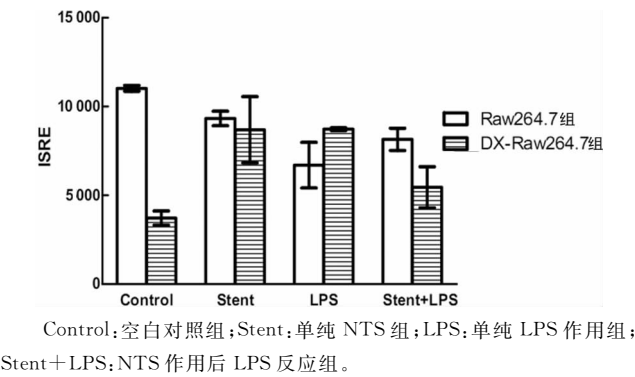


图 6 NTS 作用后 LPS 对 Raw264.7 细胞及 DX-Raw264.7 细胞胞内 ISRE 信号通路活化的影响

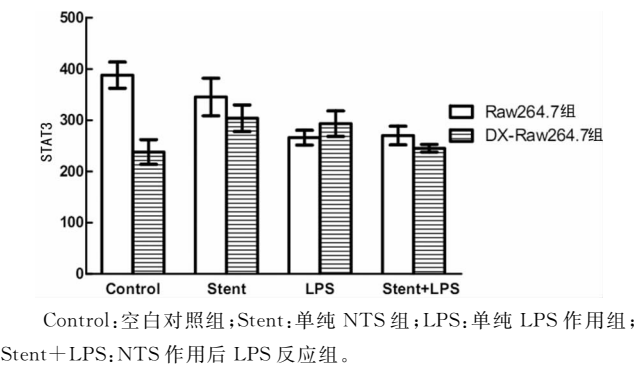


图 7 NTS 作用后 LPS 对 Raw264.7 细胞及 DX-Raw264.7 细胞胞内 STAT3 信号通路活化的影响

2.4 NTS 作用对 Raw264.7 细胞信号通路的影响。NTS 作用后,明显抑制 LPS 对 NF-κB 的活化作用,但 LPS 介导的 GAS,ISRE 及 STAT3 等通路无明显影响。但 Raw264.7 细胞

经过 DX 事先处理后,NTS 单独就可活化 NF-κB、GAS、ISRE 及 STAT3 等一系列信号通路,但镍钛合金影响 LPS 介导的信号活化,DX-Raw264.7 组与 Raw264.7 组差异有统计学意义 ($P<0.05$),见图 4~7。

3 讨论

动脉粥样硬化是心血管疾病死亡的重要原因之一,目前主要是通过向动脉狭窄部位植入金属支架,使病变部位动脉保持血流畅通以达到治疗疾病的目的^[4]。然而,金属支架作为一种外来异物,植入人体后会引机体免疫功能发生改变。现已证实,金属支架植入后,虽然通过机械张力短时间内改变血管狭窄,但由于金属支架可刺激机体免疫细胞应答,局部形成炎症反应,造成支架周边血管床炎症,容易形成再狭窄,严重地影响了支架的作用^[5]。对于支架材料的选择与应用一直是一个难题。在本研究中,证实了在 NTS 单纯作用下,基本上不引发单核巨噬细胞炎症信号通路的活化,不产生炎症因子,这点有利于进行术后恢复,这与文献报道的镍钛合金支架作用处出现过敏性炎症不同,由此似乎可以得到一种比较好的低免疫原性支架材料配比^[6]。

单核巨噬细胞作为重要的吞噬细胞,对革兰阴性菌的吞噬处理是其重要的免疫功能。LPS 是革兰阴性菌重要的胞壁成分,能与单核巨噬细胞表面 TLR4 分子结合,刺激免疫反应的发生。在哺乳动物体内,TLR4 是 LPS 最主要的识别受体^[7]。LPS 从细菌中释放出来后,会与血液中的 LPS 结合蛋白(LBP)结合,再与巨噬细胞表面的甘油磷酸肌醇结合蛋白 CD14 结合,接着 LPS 被转移到 TLR4 胞外段 MD-2 上,刺激巨噬细胞,使其发生一系列的反应^[2]。本研究着重观察镍钛合金影响单核巨噬细胞对 LPS 应答的影响,结果证实,NTS 作用后,单核巨噬细胞应答 LPS 时,其表面的杀伤性标志 FasL 及促炎症因子 IL-6 的表达都明显低于无支架作用时,说明 NTS 抑制了 Raw264.7 细胞对 LPS 的免疫应答,表明 NTS 可能会抑制单核巨噬细胞对革兰阴性菌的应答。对于单核巨噬细胞,当其通过 TLR4 与 LPS 结合后,会活化巨噬细胞内的 NF-κB 通路^[8]。分泌多种促炎症细胞因子,如 IL-6、TNF-α 等,引起一系列的炎症反应^[9-10]。而镍钛合金明显地抑制了这种 LPS 介导的 NF-κB 活化,降低了炎症反应。除此以外,对于感染,干扰素也是重要的抵抗因素,笔者关注了 GAS 或 ISRE,这两种与干扰素产生密切相关的信号通路的活化严格控制了干扰素的产生^[11],本研究中发现他们都没受到影响,由此证实镍钛合金无法影响 I 型及 II 型干扰素的产生。

DX 为糖皮质激素的一种,具有抗炎、抗过敏等多种药理作用,被临床广泛使用,在避免支架植入后狭窄中经常使用,现在已经将缓释 DX 涂层应用于支架的报道减轻局部炎症反应^[12]。在本研究中,DX 可以明显改变 NTS 的作用。DX 单独作用就可以明显降低促炎症因子及相关炎症信号分子的活化,而镍钛合金对 LPS 介导的 NF-κB 活化的抑制效应也得到了放大,同时还影响了 ISRE 及 STAT3 信号的活化,进一步地抑制了抗炎作用。所以,DX 在支架干扰 LPS 应答方面会加强这种抑制效果,使机体更难应答 LPS。

综上所述,NTS 可通过抑制单核巨噬细胞 NF-κB 活化阻碍 LPS 的免疫应答,而 DX 则会进一步放大这种抑制效应。此研究有利于从临床应用角度探讨 NTS 的应用。(下转第 581 页)

- 252-260.
- [4] Pigneux A, Mahon FX, Uhalde M, et al. Triptolide cooperates with chemotherapy to induce apoptosis in acute myeloid leukemia cells[J]. *Exp Hematol*, 2008, 36(12): 1648-1659
- [5] Yang SW, Wang W, Xie XY, et al. In vitro synergistic cytotoxic effect of triptolide combined with hydroxycamptothecin on pancreatic cancer cells[J]. *Am J Chin Med*, 2011, 39(1): 121-134.
- [6] Zhu W, Li J, Wu S, et al. Triptolide cooperates with Cisplatin to induce apoptosis in gemcitabine-resistant pancreatic cancer[J]. *Pancreas*, 2012, 41(7): 1029-1038.
- [7] 金正均. 合并用药中的相加[J]. *中国药理学报*, 1980, 1(2): 70-76.
- [8] Lesina M, Kurkowski MU, Ludes K, et al. STAT3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer[J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(4): 456-469.
- [9] Morikawa T, Baba Y, Yamauchi M, et al. STAT3 expression, molecular features, inflammation patterns, and prognosis in a database of 724 colorectal cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(6): 1452-1462.
- [10] Hsu KW, Hsieh RH, Huang KH, et al. Activation of the Notch1/STAT3/Twist signaling axis promotes gastric cancer progression[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(8): 1459-1467
- [11] Sen M, Joyce S, Panahandeh M, et al. Targeting STAT3 abrogates EGFR inhibitor resistance in cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(18): 4986-4996.
- [12] Tang SN, Fu J, Shankar S, et al. EGCG enhances the therapeutic potential of gemcitabine and CP690550 by inhibiting STAT3 signaling pathway in human pancreatic cancer[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31067.
- [13] Lin L, Hutzen B, Li PK, et al. A novel small molecule, LLL12, inhibits STAT3 phosphorylation and activities and exhibits potent growth-suppressive activity in human cancer cells[J]. *Neoplasia*, 2010, 12(1): 39-50.
- [14] Du W, Hong J, Wang YC, et al. Inhibition of JAK2/STAT3 signaling induces colorectal cancer cell apoptosis via mitochondrial pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(8): 1878-1888.
- [15] Tierney BJ, McCann GA, Cohn DE, et al. HO-3867, a STAT3 inhibitor induces apoptosis by inactivation of STAT3 activity in BRCA1-mutated ovarian cancer cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(9): 766-775.

(收稿日期: 2013-09-30 修回日期: 2013-11-24)

(上接第 577 页)

参考文献:

- [1] Nakazawa G. Stent thrombosis of drug eluting stent: pathological perspective[J]. *J Cardiol*, 2011, 58(2): 84-89.
- [2] Kounis NG, Giannopoulos S, Tsigkas GG, et al. Eosinophilic responses to stent implantation and the risk of Kounis hypersensitivity associated coronary syndrome [J]. *Int J Cardiol*, 2012, 156(2): 125-132.
- [3] Aerbajinai W, Lee K, Chin K, et al. Glia Maturation factor- γ negatively modulates TLR4 signaling by facilitating TLR4 endocytic trafficking in macrophages[J]. *J Immunol*, 2013, 190(12): 6093-6103.
- [4] Cecchi E, Giglioli C, Valente S, et al. Role of hemodynamic shear stress in cardiovascular disease[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 214(2): 249-256.
- [5] Simon DI. Inflammation and vascular injury: basic discovery to drug development[J]. *Circ J*, 2012, 76(8): 1811-1818.
- [6] Kounis NG, Giannopoulos S, Tsigkas GG, et al. Eosinophilic responses to stent implantation and the risk of Kounis hypersensitivity associated coronary syndrome [J]. *Int J Cardiol*, 2012, 156(2): 125-132.
- [7] Rubinow KB, Wall VZ, Nelson J, et al. Acyl-CoA synthetase 1 is induced by Gram-negative bacteria and lipopolysaccharide and is required for phospholipid turnover in stimulated macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(14): 9957-9970.
- [8] Schilling JD, Machkovech HM, He L, et al. Palmitate and lipopolysaccharide trigger synergistic ceramide production in primary macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(5): 2923-2932.
- [9] Zhang DY, Chen LL, Li SL, et al. Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1 β , TNF- α and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of *Escherichia coli* LPS[J]. *Innate Immun*, 2008, 14(2): 99-107.
- [10] Ogawa Y, Tasaka S, Yamada W, et al. Role of Toll-like receptor 4 in hyperoxia-induced lung inflammation in mice [J]. *Inflamm Res*, 2007, 56(8): 334-338.
- [11] Yu JH, Zhu BM, Wickre M, et al. The transcription factors signal transducer and activator of transcription 5A (STAT5A) and STAT5B negatively regulate cell proliferation through the activation of cyclin-dependent kinase inhibitor 2b(Cdkn2b) and Cdkn1a expression[J]. *Hepatology*, 2010, 52(5): 1808-1818.
- [12] König A, Leibig M, Rieber J, et al. Randomized comparison of dexamethasone-eluting stents with bare metal stent implantation in patients with acute coronary syndrome: serial angiographic and sonographic analysis [J]. *Am Heart J*, 2007, 153(6): 979.

(收稿日期: 2013-10-02 修回日期: 2013-11-29)