

## 单核细胞趋化蛋白-1 趋化巨噬细胞迁移与侵袭的体外实验研究

史兆坤, 丁鹏, 孙杰, 沈勇, 赵国, 宋晓斌  
(昆明医科大学第一附属医院神经外科, 云南昆明 650032)

**[摘要]** **目的** 探讨单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 对巨噬细胞 (NR8383) 体外迁移和侵袭作用的影响。**方法** 体外传代培养 NR8383 细胞, 免疫组化检测 NR8383 细胞上 MCP-1 特异性受体 (CCR2) 的表达, 细胞迁移和 Transwell 小室侵袭实验分别观察 MCP-1 及 CCR2 拮抗剂 (RS504393) 对 NR8383 细胞迁移和侵袭作用的影响。**结果** 免疫组化检测显示 NR8383 细胞膜上存在有 CCR2 表达; 细胞迁移和侵袭实验证明 MCP-1 促进 NR8383 细胞迁移和侵袭, 而 RS504393 抑制 NR8383 细胞迁移和侵袭; 不同浓度 MCP-1 (200 ~ 800  $\mu\text{g/L}$ ) 诱导下, NR8383 细胞迁移能力随 MCP-1 浓度增高而增强 ( $P < 0.05$ )。 **结论** MCP-1 对巨噬细胞迁移和侵袭具有促进作用, 其作用与 MCP-1 受体 CCR2 结合有关。

**[关键词]** MCP-1; 巨噬细胞; 迁移; 侵袭

**[中图分类号]** R73-37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 04 - 0041 - 05

## Experimental Study on Monocyte Chemoattractant Protein 1 for the Migration and Invasion of Macrophage in Vitro

SHI Zhao - kun, DING Peng, SUN Jie, SHEN Yong, ZHAO Guo, SONG Xiao - bin  
(Dept. of Neurosurgery, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650032, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the effect of monocyte chemoattractant protein -1 (MCP-1) on the migration and invasion of macrophage in vitro. **Methods** NR8383 macrophages were subcultured in vitro. The expression of CCR2 (the receptor of MCP-1) in macrophage was detected by immunohistochemistry, The effect of MCP-1 and anti-CCR2 polyclonal antibodies (RS504393) on the migration and invasion of NR8383 macrophage were observed by agarose and transwell chamber assay. **Results** CCR2 was expressed in membrane of NR8383 macrophage by immunohistochemical assessment. The cell migration and invasion experiments confirmed that MCP-1 induced the migration and invasion of NR8383 macrophage, but RS504393 inhibited the migration and invasion of NR8383 macrophage. The migration of macrophage was enhanced with the MCP-1 concentration. **Conclusion** MCP-1 can accelerate the migration and invasion of macrophage, which may be associated with MCP-1 receptor CCR2 binding.

**[Key words]** MCP-1; Monocyte-macrophage; Migration; Invasion

单核/巨噬细胞是一种多潜能干细胞, 具有趋化迁移粘附能力, 参与多种疾病的分子转化过程<sup>[1-3]</sup>。然而, 目前对于单核/巨噬细胞移动、粘附迁移的确切分子机制仍不是很清楚。趋化因子单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1) 是一种分泌性蛋白质, 属于 CC 类趋化因

子, 主要趋化单核/巨噬细胞、T 淋巴细胞、嗜碱性细胞、NK 细胞, 在慢性炎症、血管结构重建和纤维化、肿瘤等方面发挥重要作用<sup>[4,5]</sup>。探讨 MCP-1 及其受体对单核/巨噬细胞的影响及其在这些疾病中的作用, 对认识许多疾病的发生、发展和治疗有着重要意义。本实验旨在观察 MCP-1 及

**[作者简介]** 史兆坤 (1985 ~), 男, 山东泰安市人, 在读硕士研究生, 主要从事神经外科临床工作。

**[通讯作者]** 宋晓斌. E-mail: sxb8@sina.com

CCR2 受体拮抗剂 RS504393 对体外培养的单核 / 巨噬细胞的趋化迁移和侵袭影响, 初步探讨 MCP-1 在单核 / 巨噬细胞体外迁移和侵袭中的作用.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

NR8383 巨噬细胞株购自中国科学院典型细胞培养物保藏中心昆明细胞库; HAM' S-F12 购自美国 Gibco 公司; 高级胎牛血清购自北京中杉金桥生物技术有限公司; MCP-1 购自北京博奥森生物技术有限公司; RS504393 购自 sigma 公司.

### 1.2 方法

**1.2.1 单核巨噬细胞的体外培养** 体外传代 NR8383 细胞, 细胞呈贴壁和悬浮混合生长, 部分聚集生长, 一般为圆形或椭圆形, 功能活跃时, 可呈多突形. 细胞核圆形或椭圆形, 染色较深. 细胞质较丰富, 功能活跃时内含许多颗粒或空泡, 有折光性. 取生长良好的传代细胞进行实验研究.

**1.2.2 细胞免疫组织化学法检测趋化因子受体 CCR2 表达** 用 0.5% ~ 1% 的多聚赖氨酸处理玻片, 室温孵育 10 min, 直接在室温下自然晾干, 将细胞悬液滴在玻片上, 涂布均匀, 放入湿盒, 37 °C, 体积分数 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养. 待细胞彻底黏附在玻片上后, 用 PBS 液冲洗 2 ~ 3 遍, 95% 乙醇固定 15 min, 自然晾干后, PBS 清洗标本 3 次, 每次 2 min, 标准封闭血清孵育 20 min, 以免抗 CCR2 多克隆抗体 (1:100, Peprotech) 4 °C 孵育过夜, PBS 洗 3 遍, 以 DyLight594 山羊抗兔 (1:200) 二抗孵育 1 h, PBS 洗 3 遍, 免疫组化染色. 倒置显微镜观察、拍照.

**1.2.3 琼脂糖下细胞迁移实验体外观察单核巨噬细胞的趋化迁移** 实验分为 6 组: (1) 正常对照组; (2) 200 μg/L MCP-1 组; (3) 400 μg/L MCP-1 组; (4) 600 μg/L MCP-1 组; (5) 800 μg/L MCP-1 组; (6) CCR2 拮抗剂组.

(1) 琼脂糖平皿板的制备: 称琼脂糖 0.48 mg 于 50 mL 旋口管, 加 30 mL 去离子水, 涡旋制成均匀的琼脂糖悬液, 旋松盖子, 微波炉中加热使琼脂糖悬液沸腾, 涡旋仪上涡旋 30 s, 使其混匀. 重复沸腾涡旋 2 次, 使琼脂糖颗粒均匀溶解. 取 HAM' S/F12 培养基 30 mL, 加入另一 50 mL 旋口管中, 放置于 >68 °C 的水浴箱, 将制备好的琼脂糖液 25 mL 与 HAM' S/F12 培养基 25 mL; (1:1) 混合涡

旋制成均匀的琼脂糖混合悬液, 定量 5 mL 快速倒入直径 35 mm 培养皿中 (尽量涂布均匀平整), 室温冷却后置于 4 °C 30 min 后打孔, 孔径 3.0 mm, 间隔 2.0 mm. 再 4 °C 放置 20 min, 清除打孔时的压缩残胶. 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱平衡 2 h 再次清理胶孔, 筛选好的琼脂糖混合平皿板放入超净台紫外照射 30 min 备用. (2) 点样: 在筛选好的琼脂糖混合平皿板每列孔中间孔加入 10 μL NR8383 细胞悬液 (浓度 1.0 × 10<sup>6</sup>/L), 两侧外侧孔实验组各加不同质量浓度 (200, 400, 600, 800 μg/L) MCP-1 10 μL, 正常对照组加 10 μL 去离子水, 将琼脂糖混合平皿板放入湿盒, 置于 37 °C, 体积分数 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中 24 h 后, 40 g/L 多聚甲醛固定后在倒置显微镜下观察并拍照. 在不同平皿中重复 > 6 次, 测量最大迁移距离 (中间孔边缘与距中间孔最远的 > 2 个细胞的距离), 明确最佳趋化浓度. 以 CCR2 的特异性受体拮抗剂 RS504393 与 NR8383 共培养过夜后再加入最佳趋化浓度 MCP-1 10 μL, 重复实验 > 6 次.

**1.2.4 Transwell 细胞侵袭实验观察单核巨噬细胞侵袭作用** 实验分为 3 组: (1) 正常对照组; (2) 600 μg/L MCP-1 组; (3) CCR2 拮抗剂. Matigal 胶 70 μL 均匀平铺于 24 孔 Transwell 小室的聚碳酸酯膜上, 37 °C 预置 2 h 聚合成凝胶备用. 对照组和诱导组上室每孔加入未做任何处理的 1 × 10<sup>5</sup> 个细胞, 细胞悬液的体积为 200 μL; 对照组下室每孔中加入 500 μL 无血清培养基, 诱导组下室每孔中加入 500 μL 含 600 μg/L MCP-1 的无血清培养基, 拮抗组上室每孔加入与 RS504393 共孵育 24 h 的 1 × 10<sup>5</sup> 个细胞, 下室每孔中加入 500 μL 含 600 μg/L MCP-1 的无血清培养基, 将装有 Transwell 小室的培养板置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱, 24 h 后取出小室, 进行苏木精染色, 在倒置显微镜下观察侵袭到膜下的细胞数. 计数方法: 分别于每张膜的中央部分和周围部分随机选取 18 个不重复视野 (100 倍), 计数每个视野穿过膜的细胞数目, 每组重复实验 3 次.

### 1.3 统计学处理

数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 应用 SPSS 软件包行单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 NR8383 细胞趋化因子受体 CCR2 的表达

免疫组化法检测趋化因子受体 CCR2 的表达结

图1 NR8383 细胞免疫组化染色 ( $\times 400$ )Fig. 1 Expression of CCR2 on NR8383 cells ( $\times 400$ )

果显示: NR8383 细胞呈 CCR2 阳性, 主要表达在细胞膜上, 染色呈棕黄色, 见图 1.

## 2.2 MCP-1 及 RS504393 对 NR8383 细胞趋化迁移能力的影响

不同浓度 (200 ~ 800  $\mu\text{g/L}$ ) MCP-1 对 NR8383 细胞具有促进迁移作用, 呈浓度依赖关系, 600  $\mu\text{g/L}$  的 MCP-1 为 NR8383 细胞的最大迁移浓度; 用 600  $\mu\text{g/L}$  浓度的 MCP-1 诱导与 CCR2 拮抗剂 RS504393 (35  $\mu\text{g/L}$ ) 共孵育 24 h 的

NR8383 细胞, NR8383 细胞的最大迁移距离变小, 见图 2、表 1.

## 2.3 MCP-1 及 RS504393 对 NR8383 细胞侵袭能力的影响

在 600  $\mu\text{g/L}$  MCP-1 诱导下, NR8383 细胞的侵袭能力较正常对照细胞明显增强 ( $P < 0.05$ ); 在相同条件 MCP-1 诱导下, 给予 CCR2 拮抗剂 RS504393 共孵育 24 h 后, NR8383 细胞的侵袭能力明显减弱 ( $P < 0.05$ ), 见图 3、表 2.

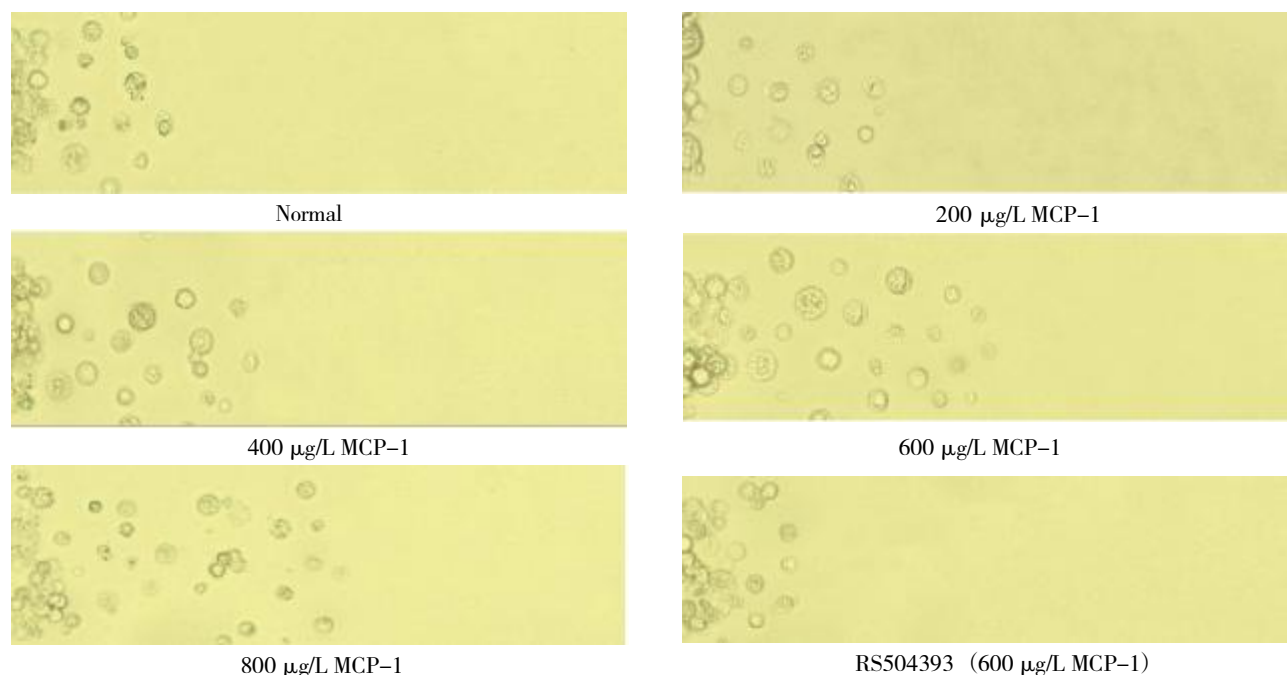
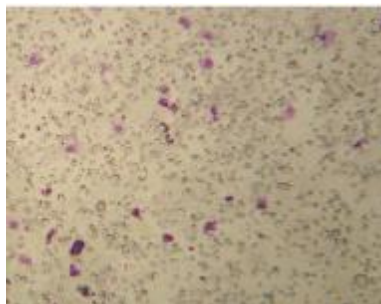
图2 不同浓度 MCP-1 及 RS504393 趋化 NR8383 细胞的迁移作用 ( $\times 200$ , 24 h)Fig. 2 Effect of different concentrations of MCP-1 or RS504393 on the migration of NR8383 cells ( $\times 200$ , 24 h)

表 1 不同浓度 MCP-1 及 RS504393 体外趋化 NR8383 细胞迁移距离 $[(\bar{x} \pm s), 24 \text{ h}]$

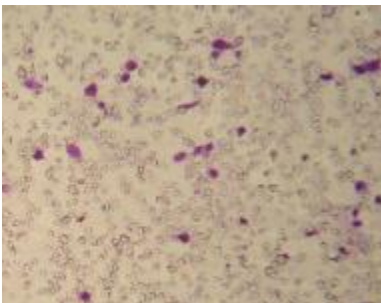
Tab. 1 Effect of different concentrations of MCP-1 and RS504393 on the migration of NR8383 cells  $[(\bar{x} \pm s), 24 \text{ h}]$

组别	n	迁移距离 (nm)
正常对照组	6	59.125 ± 0.845
200 μg/L MCP-1 组	6	94.950 ± 2.280*
400 μg/L MCP-1 组	6	136.430 ± 2.300*#
600 μg/L MCP-1 组	6	195.000 ± 2.800*#▲
800 μg/L MCP-1 组	6	195.605 ± 3.205*
RS504393 组	6	45.735 ± 3.195△

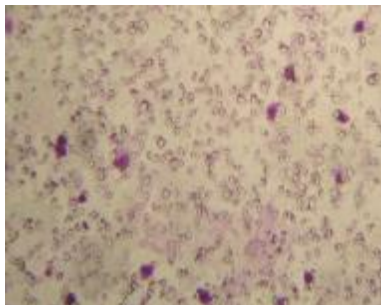
与正常对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 200 μg/L MCP-1 组比较, # $P < 0.05$ ; 与 400 μg/L MCP-1 组比较, ▲ $P < 0.05$ ; 与 600 μg/L MCP-1 组比较, △ $P < 0.05$ .



正常对照组



MCP-1 组



RS504393 组

图 3 MCP-1 及 RS504393 对 NR8383 细胞侵袭能力的影响 ( $\times 100, 24 \text{ h}$ )

Fig. 3 Effect of MCP-1 and RS504393 on the invasion of NR8383 cells ( $\times 100, 24 \text{ h}$ )

表 2 MCP-1 及 RS504393 对 NR8383 细胞侵袭作用 $[(\bar{x} \pm s), 24 \text{ h}]$

Tab. 2 Effect of MCP-1 and RS504393 on the invasion of NR8383 cells  $[(\bar{x} \pm s), 24 \text{ h}]$

组别	n	侵袭细胞数量 (个)
正常对照组	3	40.46 ± 2.40
MCP-1 组	3	69.20 ± 3.28*
RS504393 组	3	31.25 ± 2.30▲

与正常对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 MCP-1 组比较, ▲ $P < 0.05$ .

### 3 讨论

单核 / 巨噬细胞是人体起免疫作用的重要细胞, 主要来源于骨髓造血干细胞, 经过一段时间进化, 成为单核细胞, 并不断进入血流, 后到达全身各组织器官内, 发育成熟为巨噬细胞. 单核 / 巨噬细胞的作用呈多方面, 既参与特异性免疫应答; 又能够分泌血管生长因子和细胞外基质生长因子, 促进肿瘤细胞浸润. Polverini 等<sup>[6]</sup>等首先发现了腹膜的巨噬细胞有成血管特性, 参与了炎症血管和肿瘤血管的形成. 既往认为肿瘤组织中单核 / 巨噬细胞只起到直接杀伤肿瘤细胞的作用, 而这仅是经典激活型 (M1 型) 巨噬细胞. 在肿瘤微环境中, 单核 / 巨噬细胞被诱导分化和极化, 成为具有 M2 表型的肿瘤相关巨噬细胞 (TAMAs), 反而促进肿瘤发生发展<sup>[7]</sup>. Choppmann 等<sup>[8]</sup>报道巨噬细胞可以分泌血管内皮生长因子 -C、D, 与血管内皮生长因子受体 -3 结合后, 可以增加肿瘤基质淋巴管的生成, 促进肿瘤转移. 这些说明, 肿瘤组织中, 巨噬细胞通过增加免疫抑制因子, 减少免疫促进因子, 导致免疫抑制, 有利于癌细胞的浸润转移.

MCP-1 属于 CC 类趋化因子<sup>[9]</sup>, 由 Yoshimura (1989 年) 首次从胶质瘤培养上清中得到. MCP-1 作为趋化因子之一, 在肿瘤生物学行为中具有两方面正反作用, 一方面 MCP-1 趋化、吸引巨噬细胞, 参与机体免疫反应, 激发宿主抗肿瘤能力; 另一方面 MCP-1 可诱导和刺激病理性血管生成<sup>[10]</sup>, 直接诱导肿瘤细胞增殖, 还能够吸引巨噬细胞到肿瘤部位, 产生血管生长因子, 促进肿瘤细胞浸润.

CCR2 是目前所知 MCP-1 的唯一受体<sup>[11]</sup>, 其含有 7 个富含疏水氨基酸的  $\alpha$  螺旋穿膜区结构, 经异源三聚体 G 蛋白传递信号, 属于视紫红质样 G 蛋白耦联受体超家族. 其基因定位于第 3 号染色体, 编码由 355 个氨基酸残基组成的蛋白, 在多种

细胞上表达,包括单核细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞、嗜碱性粒细胞、自然杀伤细胞和T细胞等<sup>[12]</sup>。

MCP-1对单核细胞的趋化作用是通过结合单核细胞表面上的特异性受体CCR2来实现的。MCP-1与CCR2发生特异性结合后通过细胞膜上G蛋白耦联的磷脂酰肌醇途径,将信号转入细胞内,趋化并激活单核/巨噬细胞。有学者报到<sup>[13]</sup>,MCP-1通过趋化TAMs进入肿瘤组织,分泌细胞因子VEGF、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 等,促进血管生成。Goede等<sup>[14]</sup>在研究肿瘤性血管生成和生理性血管生成时发现巨噬细胞的聚集总伴有MCP-1的表达。MCP-1通过趋化TAMs进入肿瘤组织,促进分泌基质金属蛋白酶MMP2、MMP9,参与细胞外基质的破坏与重构,促进肿瘤细胞侵袭和转移<sup>[15]</sup>。Saji首先在乳腺癌研究中发现MCP-1的表达和TAMs的募集,分泌VEGF,促进乳腺癌细胞的浸润生长<sup>[16]</sup>;最近研究发现肝癌细胞分泌MCP-1趋化TAMs,分泌TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ ,参与其浸润生长<sup>[17]</sup>;Lu等发现敲除小鼠MCP-1基因,未见小鼠前列腺癌骨转移<sup>[18]</sup>。

综上所述,MCP-1及其受体在肿瘤的生物特性中具有重要的作用,对认识肿瘤发生、发展和治疗有着重要意义。本实验发现:MCP-1对NR8383细胞迁移和侵袭具有促进作用;NR8383细胞膜上表达MCP-1特异性受体CCR2,应用CCR2拮抗剂RS504393能够抑制NR8383细胞的迁移和侵袭。这提示MCP-1在巨噬细胞迁移和侵袭过程中起着重要作用,其作用是通过结合单核细胞表面上的特异性受体CCR2来实现的。根据我们实验和大量研究推测MCP-1及其特异性受体CCR2可能是抗肿瘤治疗的潜在新靶点,确切作用有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 戴波. 巨噬细胞移动抑制因子对细胞增殖、迁移、粘附的机理研究[D]. 广州:南方医科大学,2009:75-81.
- [2] 刘德明,张亦农. 高血压合并糖尿病大鼠的单核细胞异位迁移[J]. 解剖学报,2000,31(增刊):106-108.
- [3] 褚现明,李冰,安毅,等. 炎症与动脉粥样硬化关系研究进展[J]. 中国分子心脏病学杂志,2010,11(3):184-188.
- [4] MINE S,OKADA Y,TANIKAWA T,et al. Increased expression levels of monocyte CCR2 and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with diabetes mellitus [J]. Biochem Biophys Res Commun,2006,344:780-785.
- [5] KIM M Y,BYEON C W,HONG K H,et al. Inhibition of the angiogenesis by the MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) binding peptid [J]. FEBS Lett, 2005, 579: 1 597-1 601.
- [6] POLVERINI P J,COTRAN R S,GIMBRONE M A,et al. Activated macrophage induce vascular proliferation [J]. Nature,1977,269:804-806.
- [7] 朱亚飞,胡爱民. 卵巢癌组织中M2型巨噬细胞密度变化及其与卵巢癌预后的关系[J]. 山东医药,2011,51(30):78-81.
- [8] SCHOPPMANN S F,BIRNER P,STIFEKL J,et al. Tumor associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis [J]. Am J Pathol,2002,161(3):947-956.
- [9] YOSHIMURA T,YUHKI N,MOORE S K,et al. Human monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE[J]. FEBS Lett,1989,244(2):487-493.
- [10] AUBRY K,BARRIERE G,CHABLE-RABINOVITCH H,et al. Molecular mechanisms regulating the angiogenic phenotype in tumors:clinical impact in the future [J]. Anticancer Res,2007,27(5A):3 111-3 119.
- [11] KRUIZINGA R C,BESTEBROER J,BERGHUIS P,et al. Role of chemokines and their receptors in cancer[J]. Curr Pharm Des,2009,15(29):3 396-3 416.
- [12] 张国栋,孙建辉. 单核细胞趋化蛋白-1在冠心病中的研究[J]. 国际心血管病杂志,2008,35(6):370-372.
- [13] LIN H H,LIAO C J,LEE Y C,et al. Lipocalin-2-induced cytokine production enhances endometrial carcinoma cell survival and migration[J]. Int J Biol Sci,2011,7(1):74.
- [14] GOEDE V,BROGELLI L,ZICHEM,et al. Induction of inflammatory angiogenesis by monocyte chemoattractant protein 2 1. Int J Cancer,1999,82:765-770.
- [15] MANTOVANI A,SCHIOPPA T,PORTA C,et al. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion [J]. Cancer Metastasis Rev,2006,25(3):315-322.
- [16] SAJI H,KOIKE M,YAMORI T,et al. Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma [J]. Cancer,2001,92(5):1 085-1 091.
- [17] DAGOUASSAT M,SUFFEE N,HLAWATY H,et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/CCL2 secreted by hepatic myofibroblasts promotes migration and invasion of human hepatoma cells [J]. Int J Cancer, 2010,126(5): 1 095-1 108.
- [18] LU Y,CHEN Q,COREY E,et al. Activation of MCP-1/CCR2 axis promotes prostate cancer growth in bone [J]. Clin Exp Metastasis,2009,26(2):161-169.

(2014-02-17收稿)