

[文章编号] 1000-1182(2009)06-0673-03

# C-反应蛋白影响单核细胞趋化能力的研究

孟姝<sup>1</sup> 张琳<sup>1</sup> 杨禾<sup>2</sup> 吴亚菲<sup>2</sup> 葛颂<sup>3</sup> 赵蕾<sup>2</sup>

(1.口腔疾病研究国家重点实验室, 四川大学; 2.四川大学华西口腔医院 牙周科, 四川 成都 610041;  
3.遵义医学院附属口腔医院 口腔内科, 贵州 遵义 563003)

**[摘要]** 目的 通过检测不同质量浓度C-反应蛋白(CRP)对体外培养的人单核细胞趋化能力的影响, 探讨CRP作为炎症介质联系牙周炎与冠心病的分子机制。方法 采用不同质量浓度CRP作用于体外培养的THP-1单核细胞, 采用Transwell趋化实验检测单核细胞被趋化因子单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)趋化的数量。结果 Transwell趋化实验发现, CRP作用于THP-1单核细胞后可增强其趋化能力。CRP质量浓度为 $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 单核细胞的趋化数量上调( $P<0.05$ ); 随着CRP质量浓度升高, 趋化的单核细胞增多( $P<0.05$ )。结论 CRP能增强THP-1单核细胞的趋化能力, 且呈剂量依赖性。

**[关键词]** 牙周炎; 单核细胞; 动脉粥样硬化; 冠心病

**[中图分类号]** R 781 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2009.06.024

**Effects of C-reactive protein on chemotaxis ability of monocytes *in vitro*** MENG Shu<sup>1</sup>, ZHANG Lin<sup>1</sup>, YANG He<sup>2</sup>, WU Ya-fei<sup>2</sup>, GE Song<sup>3</sup>, ZHAO Lei<sup>2</sup>. (1. State Key Laboratory of Oral Diseases, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Dept. of Periodontology, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Dept. of Oral Medicine, The Affiliated Stomatology Hospital, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of C-reactive protein(CRP) on monocytes chemotaxis ability *in vitro*. **Methods** Transwell chemotaxis assay was used to evaluate the changes of chemotactic ability of THP-1 monocytes in each group treated with CRP in different concentration. **Results** CRP increased the number of attracted monocytes in response to MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1). When treated with CRP concentration at  $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , the number of chemotactic monocytes increased( $P<0.05$ ). The number of attracted monocytes increased as CRP concentration was elevated( $P<0.05$ ). **Conclusion** CRP can increase chemotactic ability of THP-1 monocytes in concentration dependent manner.

**[Key words]** periodontitis; monocytes; atherosclerosis; coronary heart disease

牙周炎是一种由细菌感染引起的慢性炎症性疾病, 不仅是成年人失牙的主要原因, 还与心血管疾病的发生密切相关<sup>[1]</sup>。牙周感染可以导致患者外周血中的多种炎症因子表达上调<sup>[2-4]</sup>, 其中, C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)是一项敏感的炎症反应性指标。现有研究<sup>[5]</sup>证实, 牙周炎患者的外周血CRP水平随着牙周炎症程度的加重而升高, 炎症越重CRP水平越高。全身健康的牙周炎患者外周血CRP水平为 $1\sim 10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ <sup>[6-7]</sup>。

冠状动脉粥样硬化性心脏病(coronary heart dis-

ease, CHD)的主要特征是在动脉壁上形成粥样硬化斑块, 在斑块内有大量炎症细胞浸润, 其中约80%的炎症细胞是来源于外周血中的单核细胞<sup>[8-9]</sup>。动脉粥样硬化斑块的形成过程中, 首先单核细胞向血管内皮趋化游走, 进入血管壁后成为巨噬细胞, 巨噬细胞吞噬脂质后变成泡沫细胞, 构成粥样硬化斑块的主要部分。由此可见, 血液循环中的单核细胞趋化进入血管壁这一过程是动脉粥样硬化发生发展过程中的重要环节<sup>[10-11]</sup>。

牙周炎症能引起外周血CRP水平升高, 而外周血CRP水平升高与冠心病的发生有密切的关系, 是冠心病的独立危险因素<sup>[12-13]</sup>。大量的流行病学资料已显示牙周炎与冠心病具有相关性。牙周炎可能是冠心病的独立危险因素, 而CRP有可能是联系2种疾病的重要介质。外周血CRP水平升高是否会对单核

[收稿日期] 2009-02-25; [修回日期] 2009-06-29

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划资助项目(2007BAI18B02); 国家自然科学基金资助项目(30672324)

[作者简介] 孟姝(1979—), 女, 四川人, 讲师, 博士

[通讯作者] 吴亚菲, Tel: 028-85501471

细胞的趋化能力产生影响,目前尚无相关报道。本研究在体外模拟牙周炎症时外周血的CRP质量浓度环境,检测CRP对体外培养的人单核细胞趋化能力的影响,探讨CRP作为炎症介质联系牙周炎与冠心病的分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

THP-1单核细胞株由四川大学口腔疾病研究国家重点实验室提供。主要试剂包括:质量浓度为 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的CRP(Calbiochem公司,美国);单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)(Peprotech公司,英国);MCP-1中和抗体(Biolegend公司,美国);Transwell趋化小室(Transwell Costar公司,美国)。

1.2 研究方法

1.2.1 实验分组 实验组1: $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  CRP+THP-1单核细胞;实验组2: $4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  CRP+THP-1单核细胞;实验组3: $6\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  CRP+THP-1单核细胞;实验组4: $8\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  CRP+THP-1单核细胞;实验组5: $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  CRP+THP-1单核细胞;空白对照组:未受CRP刺激的THP-1单核细胞,即CRP质量浓度为 $0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.2.2 细胞培养与处理 THP-1单核细胞传代后第2天将细胞调整到每毫升 $5\times 10^5$ 个,将细胞悬液接种至24孔板,实验组分别给予4、8、12、16、20  $\mu\text{L}$  CRP,空白对照组不加CRP溶液,加入培养基RPMI-1640使各实验组和空白对照组的溶液总体积达到2 mL,使各实验组的CRP工作质量浓度分别为2、4、6、8、10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,空白对照组的CRP质量浓度为 $0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,每组均设3个复孔,37℃、5%CO<sub>2</sub>孵育24 h。

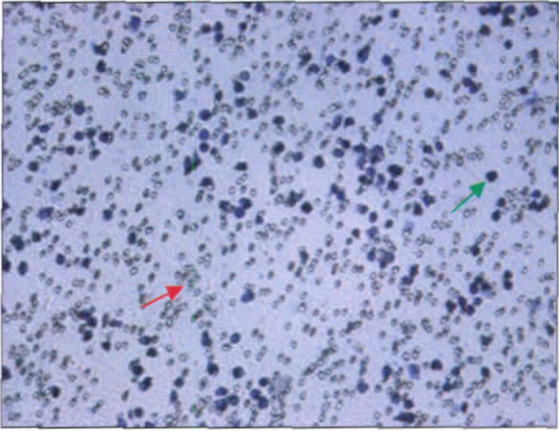
1.2.3 Transwell趋化实验 本实验采用Transwell趋化小室进行THP-1单核细胞趋化实验,以被单核细胞趋化因子MCP-1趋化至下室的细胞数来检测其趋化能力。将经过处理的各组THP-1细胞离心后,用PBS冲洗3次后重悬。趋化实验用Transwell小室进行,下室为趋化因子MCP-1溶液,质量浓度为 $500\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ,上室为细胞悬液,上下室间隔以孔径 $5\text{ }\mu\text{m}$ 的硝酸纤维素微孔滤膜。每组均设有3个趋化小室。

将小室置于37℃,5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育60 min。取出滤膜,清洗擦拭接触细胞悬液的滤膜面以去除细胞。以1%的多聚甲醛固定,黏附于MCP-1滤膜接触面的细胞以Giemsa染液染色。在200倍显微镜下对5个视野的细胞进行连续计数,实验由同一人单盲操作。为了保持实验的一致性,各实验组均设置了阴性对照组,阴性对照组中趋化小室的下室除加入

MCP-1外,还加入了MCP-1中和抗体,以抑制MCP-1的化学趋化能力。每组的结果以公式计算:THP-1单核细胞的趋化数=实验组的趋化细胞数-阴性对照组的趋化细胞数。

2 结果

相差显微镜下观察可见,Giemsa染色的THP-1单核细胞呈蓝紫色,散在分布于Transwell趋化小室的硝酸纤维素微孔滤膜上(图1)。不同质量浓度CRP刺激24 h后,各实验组分别同空白对照组比较,THP-1单核细胞趋化数增加,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。随着CRP质量浓度增高,实验组趋化的THP-1单核细胞数也逐渐增多,各实验组之间两两比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ),说明THP-1单核细胞趋化能力随着CRP质量浓度增加而增强(表1)。



红色箭头:微孔;绿色箭头:THP-1单核细胞。  
图1 Transwell趋化小室微孔滤膜上的THP-1单核细胞 Giemsa染色  $\times 100$

Fig 1 THP-1 monocytes attached to micropore film in Transwell chamber Giemsa stain  $\times 100$

表1 不同质量浓度CRP作用下THP-1单核细胞的趋化数( $n=3$ )

Tab 1 Numbers of THP-1 monocytes chemoattracted by CRP( $n=3$ )

分组	CRP质量浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	趋化细胞 数目/个	与对照组的 百分比/%
空白对照组	0	$156\pm 7$	100.00
实验组1	2	$162\pm 8^{\Delta*}$	103.85
实验组2	4	$186\pm 11^{\Delta*}$	119.23
实验组3	6	$233\pm 14^{\Delta*}$	149.36
实验组4	8	$239\pm 17^{\Delta*}$	153.21
实验组5	10	$332\pm 20^{\Delta*}$	212.82

注: $\Delta$ 各实验组与空白对照组之间比较, $P<0.05$ ; \*各实验组之间两两比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

本研究结果发现,CRP在体外能增加单核细胞

的趋化数量,即增强了单核细胞的趋化能力,且单核细胞趋化数量随着CRP质量浓度增加而增加。提示外周血CRP水平的升高可能通过增强单核细胞趋化能力,在动脉粥样硬化斑块的形成中发挥作用。

外周血CRP质量浓度可以作为心血管病变危险等级的判断指标:小于 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时为低度危险,介于 $1\sim 3\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时为中度危险,大于 $3\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时为高度危险<sup>[14]</sup>。由此可见,即使是全身健康的牙周炎患者,也可能是心血管病变的危险人群。本研究中CRP的质量浓度范围主要依据牙周炎患者外周血CRP水平设定。研究发现全身健康的牙周炎患者外周血CRP质量浓度为 $1\sim 10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ <sup>[5]</sup>;在排除混杂因素后,中、重度牙周炎患者外周血CRP质量浓度为 $4.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,其中CRP大于等于 $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的人数占12.5%<sup>[6]</sup>。因此,本研究在实验组中采用的CRP水平分别为2、4、6、8、 $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,涵盖了多数牙周炎患者外周血CRP水平。此外,CRP在慢性感染患者体内是一个长期慢性累积的过程,CRP在血浆中的半衰期是19h,本实验选择了24h为检测时间点,在其作用过程中,CRP能发挥稳定而持久的作用。

虽然人外周血单核细胞是最为接近实际临床病理生理效果的研究体系,但是由于个体的年龄、性别、遗传、环境以及献血当日的实际情况不尽相同,导致单核细胞的数量、反应性各不一致,可能增大实验结果的误差。THP-1单核细胞株具有细胞数量多、实验条件易于控制、实验结果一致性好的优点,同实验动物的单核细胞相比,可以较好的模拟体内的CRP的病理生理作用。THP-1单核细胞直径约为 $13\mu\text{m}$ ,采用 $5\mu\text{m}$ 微孔的滤膜可以保证被趋化的细胞在变形穿过微孔的过程中被黏附在滤膜上,而不会进入下室液体中。

在已知的细胞因子中,肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1也具有趋化活性,已有研究<sup>[15]</sup>显示CRP可以刺激单核细胞产生TNF- $\alpha$ 。本实验中,CRP刺激THP-1单核细胞24h后,先将THP-1单核细胞离心,并用PBS缓冲液漂洗后再进行趋化实验,目的是排除其他细胞因子的趋化活性所造成的影响。而且在每个实验组的阴性对照组中,加入抗MCP-1中和抗体后,单核细胞趋化活性明显阻断,说明在本实验中,MCP-1是起主要作用的趋化因子,从而排除了非特异性趋化作用造成的单核细胞数的增加。

由于本实验中各组的MCP-1质量浓度相同,单核细胞趋化数不同可能是由于其细胞表面受体的数量不同而引起的。研究发现,趋化因子受体CC类趋化因子受体-2(CC chemokine receptor 2, CCR2)的

数目较少,促炎细胞因子可通过抑制CCR2基因表达使细胞趋化活性降低。而本研究中,CRP水平的升高是否使单核细胞表面表达的CCR2数量增加,从而导致其趋化能力增强,尚待进一步的研究证实。

## [参考文献]

- [1] Beck JD, Offenbacher S. The association between periodontal diseases and cardiovascular diseases: A state-of-the-science review[J]. *Ann Periodontol*, 2001, 6(1): 9-15.
- [2] D'Aiuto F, Parkar M, Andreou G, et al. Periodontitis and atherogenesis: Causal association or simple coincidence[J]. *J Clin Periodontol*, 2004, 31(5): 402-411.
- [3] Geerts SO, Legrand V, Charpentier J, et al. Further evidence of the association between periodontal conditions and coronary artery disease[J]. *J Periodontol*, 2004, 75(9): 1274-1280.
- [4] Howell TH, Ridker PM, Ajani UA, et al. Periodontal disease and risk of subsequent cardiovascular disease in US male physicians[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2001, 37(2): 445-450.
- [5] Noack B, Genco RJ, Trevisan M, et al. Periodontal infections contribute to elevated systemic C-reactive protein level[J]. *J Periodontol*, 2001, 72(9): 1221-1227.
- [6] Slade GD, Offenbacher S, Beck JD, et al. Acute-phase inflammatory response to periodontal disease in the US population[J]. *J Dent Res*, 2000, 79(1): 49-57.
- [7] Slade GD, Ghezzi EM, Heiss G, et al. Relationship between periodontal disease and C-reactive protein among adults in the Atherosclerosis Risk in Communities study[J]. *Arch Intern Med*, 2003, 163(10): 1172-1179.
- [8] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease[J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115-126.
- [9] Genco RJ, Offenbacher S, Beck JD. Periodontal disease and cardiovascular disease: Epidemiology and possible mechanisms [J]. *J Am Dent Assoc*, 2002, 133(Suppl): 14s-22s.
- [10] Meurman JH, Sanz M, Janket SJ. Oral health, atherosclerosis, and cardiovascular disease[J]. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2004, 15(6): 403-413.
- [11] Southerland JH, Taylor GW, Moss K, et al. Commonality in chronic inflammatory diseases: Periodontitis, diabetes, and coronary artery disease[J]. *Periodontol* 2000, 2006, 40: 130-143.
- [12] Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, et al. Inflammation, aspirin, and risk of cardiovascular disease in apparently healthy men[J]. *N Engl J Med*, 1997, 336(14): 973-979.
- [13] Heinrich J, Schulte H, Schonfeld R, et al. Association of variables of coagulation, fibrinolysis and acute-phase with atherosclerosis in coronary and peripheral arteries and those arteries supplying the brain[J]. *Thromb Haemost*, 1995, 73(3): 374-379.
- [14] Lloyd-Jones DM, Levy D. C-reactive protein in the prediction of cardiovascular events[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348(11): 1059-1061.
- [15] Zhang R, Becnel L, Li M, et al. C-reactive protein impairs human CD14<sup>+</sup> monocyte-derived dendritic cell differentiation, maturation and function[J]. *Eur J Immunol*, 2006, 36(11): 2993-3006.