

## 低剂量阿糖胞苷对 Jurkat T 淋巴细胞 CD147 表达的影响

王汉伟<sup>1</sup> 张俊峰<sup>1</sup> 魏冬<sup>1</sup> 郭竹英<sup>2</sup> 徐芒华<sup>2</sup> 高丰厚<sup>2</sup>

**[摘要]**目的:探讨低剂量阿糖胞苷(Ara-C)对 Jurkat T 淋巴细胞 CD147 表达的影响。方法:实验细胞分 6 组,为对照组和 1、5、10、20、30 ng/ml Ara-C 组。采用 RT-PCR、Western blot 和流式细胞术分别检测 Ara-C 干预前后 Jurkat 细胞 CD147 基因和蛋白的表达。用倒置显微镜观察、比较 Ara-C 干预前后 Jurkat 细胞集落形成情况。结果:Ara-C 各浓度组中细胞 CD147 mRNA 和蛋白的表达均明显高于对照组( $P < 0.01$ ) ,Ara-C 干预组细胞集落形成明显增加。结论:低剂量 Ara-C 可上调 Jurkat T 淋巴细胞 CD147 的表达,增强细胞间黏附力。

**[关键词]** Jurkat 细胞;阿糖胞苷;CD147;集落形成;动脉粥样硬化

**[中国图书资料分类法分类号]** R 331.144 **[文献标识码]** A

### The effect of Ara-C at low concentrations on CD147 expression in Jurkat cells

WANG Han-wei<sup>1</sup> ZHANG Jun-feng<sup>1</sup> WEI Dong<sup>1</sup> GUO Zhu-ying<sup>2</sup> XU Mang-hua<sup>2</sup> GAO Feng-hou<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiology 2. Center of Laboratory, The No. 3 People's Hospital, School of Medicine Shanghai Jiaotong University Shanghai 201900, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Ara-C at low concentrations on extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) expression in Jurkat cells. **Methods:** Jurkat cells were divided into six groups: control group and cells treated with different concentrations of Ara-C at 1, 5, 10, 20, and 30 ng/ml. CD147 mRNA and protein expression were assayed by RT-PCR, Western blot and flow cytometry respectively. The colony formation in Jurkat cells which was stimulated with Ara-C or not was observed by inverted microscope. **Results:** Different concentrations of Ara-C significantly up-regulated the expressions of CD147 mRNA and protein, and increased the colony formation in Jurkat cells ( $P < 0.01$ ). **Conclusions:** Ara-C at low concentrations can enhance the expression of CD147 and increase the adhesive force in Jurkat cells.

**[Key words]** Jurkat cells; Ara-C; CD147; colony formation; atherosclerosis

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症性疾病,多种炎症细胞与 AS 发生、发展相关<sup>[1]</sup>。其中 T 淋巴细胞作为一种重要的炎症细胞,在 AS 发生、发展中起到了重要的作用<sup>[2]</sup>。活化后的 T 淋巴细胞主要通过改变 AS 斑块的稳定性发挥作用<sup>[3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>表明,在此过程中,T 淋巴细胞 CD147 分子的高表达与活化有重要作用。CD147 活化后可诱导基质金属蛋白酶(MMPs)分泌,后者参与斑块周围细胞外基质的降解,从而导致 AS 斑块的不稳定和破裂。有文献<sup>[5]</sup>报道,应用低剂量的 Ara-C 治疗老年白血病患者时,发现有原因不明 AS 斑块消退的现象;我们推测,低剂量 Ara-C 有可能通过调控 T 淋巴细胞 CD147 表达与活化发挥作用。

因此,本研究拟采用低剂量 Ara-C 处理 Jurkat 细胞,观察 CD147 表达与活化情况,为进一步探讨 T 淋巴细胞在 AS 中的作用提供线索与基础。

### 1 材料与方法

**1.1 材料与试剂** RPMI T 淋巴 1640 培养基干粉购自 Gibco 公司,Ara-C 购自 Sigma 公司,胎牛血清购自 Hyclone 公司,Jurkat T 淋巴细胞购自中科院上海细胞库,FITC 标记单克隆抗 CD147 抗体购自 BD 公司,HRP 标记 GAPDH 单克隆抗体购自上海康成公司,FITC 标记鼠 IgG<sub>1</sub> 购自 Santa crus 公司,Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司,RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司,流式细胞仪购自 Beckman Coulter 公司,PCR 仪购自 BIO-RAD 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞株和细胞培养** Jurkat T 淋巴细胞悬浮培养于 10% 胎牛血清、50 U/ml 青霉素、50 μg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基中,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养,每 2~3 天换液 1 次。细胞生长至 80% 时,1:2 传代培养,Jurkat T 淋巴细胞呈

[收稿日期] 2010-11-09

[基金项目] 上海市教育委员会科研创新资助项目(09YZ80),上海市宝山区科委基金资助项目(06-E-3)

[作者单位] 上海交通大学医学院附属第三人民医院 1. 心内科, 2. 实验中心,上海 201900

[作者简介] 王汉伟(1976-)男,硕士研究生。

[通讯作者] 张俊峰,副主任医师。E-mail: zhangjf1222@yahoo.com.cn

抱团悬浮生长。取对数生长期细胞按  $1 \times 10^6$  接种于六孔板中,用 Ara-C 分别以浓度 1、5、10、20、30 ng/ml 刺激后,置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度培养箱中培养 48 h,同时设加无菌 PBS 的对照组。

1.2.2 RT-PCR 检测 Jurkat T 淋巴细胞 CD147 mRNA 水平 收集经不同浓度 Ara-C 刺激 48 h 的 Jurkat T 淋巴细胞及对照细胞,按 Trizol 使用说明书提取细胞总 RNA,紫外分光光度仪测总 RNA 浓度。分别取  $1 \mu\text{g}$  RNA,按试剂盒说明书进行反转录;根据文献[6],引物由上海生工生物工程有限公司合成,CD147 基因的上游引物:5'-TCC TGG GCA TCG TGG CT-3',下游引物:5'-CCT CTG GCG GAC GTT CTT G-3'; GAPDH 上游引物:5'-TCC CAT CAC CAT CTT CCA G-3',下游引物:5'-ATG AGT CCT TCC ACG ATA CC-3'。其中 CD147 扩增片段长度为 164 bp,GAPDH 扩增片段为 307 bp。PCR 扩增反应条件为  $94^\circ\text{C}$  预变性 2 min  $94^\circ\text{C}$  变性 30 s  $55^\circ\text{C}$  退火 30 s  $72^\circ\text{C}$  延伸 1 min,共进行 30 个循环。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统中,紫外灯下观察拍照,进行半定量分析,每组实验重复 3 次。

1.2.3 Western blot 检测 CD147 蛋白水平 收集同前处理的细胞,按  $1 \times 10^6$  个细胞加入  $150 \mu\text{l}$  的细胞裂解液,提取细胞总蛋白。制备 12% SDS-PAGE 分离胶及 5% 的浓缩胶。根据样品蛋白浓度,按总蛋白量为  $20 \mu\text{g}$  计算每孔上样体积。电泳转膜,再染色、洗膜,5% 的脱脂奶粉封闭 1~2 h,杂交袋内结合 CD147 一抗 (1:1 000),HRP 标记鼠抗 GAPDH (1:3 000) 作为内参  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜。次日室温摇床上摇晃孵育 1 h,TBS-T 洗膜 10 min  $\times$  3 次,二抗加入 HRP 标记的  $\text{IgG}_1$  (1:2 500),室温下孵育 2 h 后,TBS-T 洗膜 2 次,再用 TBS 洗膜 1 次。用 ECL 化学发光显色,曝光显影,冲洗 X 光片,所得底片在成像系统中拍照,用 Quantity one 软件分析得灰度值。分析 CD147 总蛋白水平的变化,实验重复 3 次。

1.2.4 流式细胞仪检测 Jurkat T 淋巴细胞 CD147 的表达率及平均荧光强度 (MFI) 收集经不同浓度 Ara-C 刺激 48 h 后的 Jurkat 细胞和对照细胞,计数后取  $5 \times 10^5$  个细胞移入流式测定管中;离心后去上清,加入 2 ml PBS 清洗 1 次,弃上清;加入 PBS  $50 \mu\text{l}$  轻轻震荡混匀后,加入  $10 \mu\text{l}$  FITC 标记兔抗人 CD147 抗体,室温避光孵育 30 min;用 2 ml PBS 充分洗涤 (3 000 r/m 离心 5 min),弃上清,加入 0.4 ml PBS 重悬细胞,于流式细胞仪上检测。以 FITC 标记

小鼠  $\text{IgG}_1$  作为同型对照。每个样品测定 10 000 个活细胞数,每组实验重复 3 次。

1.2.5 Ara-C 对 Jurkat T 淋巴细胞生长的影响 根据上述实验结果,选择 10 ng/ml Ara-C 刺激 Jurkat 细胞 24 h 和 48 h 后,用倒置显微镜观察细胞形态和集落变化情况。2 人双盲连续观察,随机选择 3 个不同视野,各组间重复比较。

1.3 统计学方法 采用方差分析和  $q$  检验。

## 2 结果

2.1 各组 CD147 mRNA 水平的变化比较 结果显示,与对照组 (0 ng/ml) 比较,1、5、10、20、30 ng/ml 浓度水平的 Ara-C 刺激后,均明显上调 Jurkat T 淋巴细胞 CD147 mRNA 水平 ( $P < 0.01$ ) (见表 1),20 ng/ml 时达峰值 (见图 1)。

表 1 Ara-C 刺激 Jurkat 细胞 48 h 后 CD147 mRNA 灰度值变化 ( $n_i = 3; \bar{x} \pm s$ )

Ara-C (ng/ml)	CD147 mRNA	F	P	MS <sub>组内</sub>
0	1 678.90 $\pm$ 543.67			
1	2 771.68 $\pm$ 246.54 **			
5	3 323.24 $\pm$ 468.38 **	32.884	<0.01	12 191 233.480
10	4 141.68 $\pm$ 345.87 **			
20	5 663.77 $\pm$ 490.83 **			
30	4 862.20 $\pm$ 459.48 **			

$q$  检验:与 0 组比较 \*\*  $P < 0.01$



1:Ara-C;2:0 ng;3:1 ng;4:5 ng;5:10 ng;6:20 ng;7:30 ng

图 1 Ara-C 对 Jurkat 细胞 CD147 mRNA 表达的影响

2.2 各组 CD147 蛋白水平比较 结果显示,5~20 ng/ml Ara-C 刺激 Jurkat 细胞后,均明显上调了 CD147 蛋白水平 ( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ ) (见表 2 及图 2)。

2.3 流式细胞仪检测 CD147 的表达率和 MFI 结果 与对照组相比,1、5、10、20、30 ng/ml Ara-C 组刺激 Jurkat 细胞后 CD147 的表达率均无明显变化,均在 99.8% 左右 ( $P > 0.05$ );但进一步比较 MFI 的变化发现,Ara-C 各组可上调 CD147 MFI,10 ng/ml 浓

度 MFI 上调最高,上调率高达 76%。5、10 和 20 ng/ml Ara-C 组 CD147 膜蛋白表达量的变化均明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ) (见图 3、表 3)。

表 2 Ara-C 刺激 Jurkat 细胞 48 h 后 CD147 蛋白灰度值变化 ( $n_i = 3; \bar{x} \pm s$ )

Ara-C(ng/ml)	CD147 蛋白	F	P	MS <sub>组内</sub>
0	4 102.52 ± 978.92			
5	6 860.87 ± 768.36*	11.11	<0.01	81 185 887.266
10	8232.57 ± 1135.34**			
20	8 799.73 ± 1 380.54**			

q 检验:与 0 组比较\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$

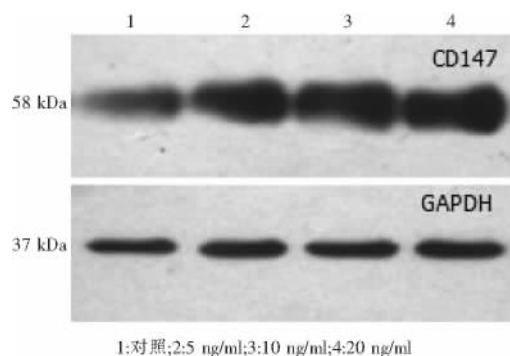


图 2 Ara-C 对 Jurkat 细胞 CD147 蛋白表达的影响

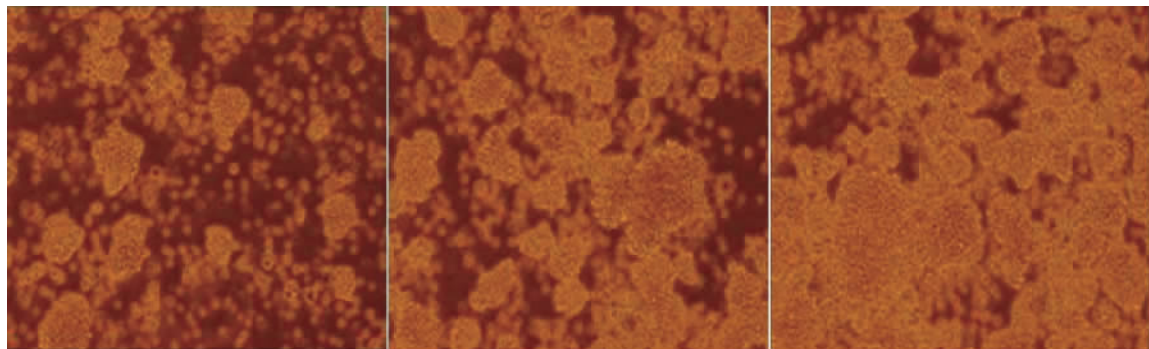


图 3 Ara-C 刺激 Jurkat 细胞后对细胞集落形成的影响

度糖基化的跨膜蛋白;最早在肿瘤细胞表面发现,属于免疫球蛋白超家族成员,命名为 TCSF/EMMPRIN<sup>[7]</sup>;是 MMPs 的重要调节因子,因可促进成纤维细胞分泌 MMPs 而得名。Schmidt 等<sup>[4]</sup>研究发现:急性心肌梗死(AMI)患者单核细胞表面 CD147 的表达量明显高于稳定型心绞痛患者;上调 CD147 的表达,可相应增强单核细胞 MT1-MMP 的表达及增加 MMP-9 活性,AMI 患者血管再通 6 个月后,CD147、MT1-MMP 和 MMP-9 均恢复至正常水平,从而推测 CD147 与 AS 斑块的稳定性相关。

AS 斑块局部存在着大量的炎症细胞,而细胞之间的黏附聚集又增强了斑块局部炎症细胞的浸润。T 淋巴细胞作为一种重要的炎症细胞,可表达多种

表 3 Ara-C 刺激 Jurkat 细胞 48 h 后 CD147 阳性率及 MFI 变化 ( $n_i = 3; \bar{x} \pm s$ )

Ara-C(ng/ml)	CD147 阳性率(%)	CD147 MFI
0	99.6 ± 0.21	21.4 ± 2.2
1	99.8 ± 0.12	25.1 ± 3.4
5	99.9 ± 0.10	33.1 ± 1.8**
10	99.8 ± 0.15	37.2 ± 3.6**
20	99.7 ± 0.23	33.2 ± 2.8**
30	99.8 ± 0.17	24.7 ± 1.6
F	1.11	16.16
P	>0.05	<0.01
MS <sub>组内</sub>	0.029	7.167

q 检验:与 0 组比较\*\*  $P < 0.01$

2.4 Ara-C 促进 Jurkat 细胞集落形成 Ara-C (10 ng/ml) 刺激 Jurkat 细胞 24、48 h 后,用倒置显微镜观察各组细胞集落形成情况。正常 Jurkat 细胞呈抱团悬浮生长,形成较为均匀的小细胞集落,刺激 24、48 h 后的 Jurkat 细胞与对照组细胞相比,形成明显较大细胞黏附集落(见图 3)。

### 3 讨论

CD147 平均相对分子质量为 58000,是一种高

炎症因子与自身细胞及其他炎症细胞相互作用,进而影响 AS 斑块局部炎症细胞的浸润和斑块的不稳定<sup>[8-9]</sup>。在 AS 斑块局部炎症细胞浸润的过程中,T 淋巴细胞活化及其 CD147 的表达也增加是同时出现的<sup>[10]</sup>。有文献<sup>[11]</sup>表明,Ara-C 可通过上调 CD86 表达而活化 T 淋巴细胞,我们推测 Ara-C 在活化 T 淋巴细胞同时,可影响到细胞 CD147 的表达。因此,本实验应用 Ara-C 作用于 Jurkat T 淋巴细胞,结果表明低剂量的 Ara-C 可上调 Jurkat T 淋巴细胞 CD147 mRNA 的表达和蛋白水平;同时,发现随着 Jurkat T 淋巴细胞的活化和 CD147 的上调,细胞之间的黏附力也随之增强,细胞集落形成明显增多,这与 CD147 本身就是黏附分子是一致的。研究<sup>[12]</sup>表

明 CD147 的作用是通过多配体蛋白聚糖-1 诱导 T 淋巴细胞黏附和迁移。因此,我们推测上调 CD147 的表达,可增强 AS 斑块局部炎症细胞的黏附和迁移力。

现有资料<sup>[4]</sup>表明,CD147 通过调节斑块局部 MMPs 的表达和活性,从而导致斑块的不稳定。本研究结果证实,细胞 CD147 mRNA 表达和蛋白水平明显上调,尤其是细胞表面膜蛋白的表达量上升明显;因此,我们推测低剂量 Ara-C 可通过调控 CD147 的表达来促进 AS 斑块的不稳定,进而引起斑块的破裂消退。由于 Ara-C 作用于细胞后涉及多种基因、转录因子的变化,常为细胞内多种信号转导通路相互作用、相互协调的结果<sup>[13]</sup>;因此,Ara-C 通过何种信号途径影响 T 细胞 CD147 的表达,以及在 AS 发生、发展中有什么作用,亟待进一步研究。

#### [参 考 文 献]

- [1] Gotsman I, Sharpe AH, Lichtman AH. T-cell costimulation and coinhibition in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2008, 103(11): 1220-1231.
- [2] Aukrust P, Otterdal K, Yndestad A, *et al.* The complex role of T-cell-based immunity in atherosclerosis [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2008, 10(3): 236-243.
- [3] Weyand CM, Younge BR, Goronzy JJ. T cells in arteritis and atherosclerosis [J]. *Curr Opin Lipidol* 2008, 19(5): 469-477.
- [4] Schmidt R, Bültmann A, Ungerer M, *et al.* Extracellular matrix metalloproteinase inducer regulates matrix metalloproteinase activity in cardiovascular cells: implications in acute myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2006, 113(6): 834-841.
- [5] 丁国林. 小剂量阿糖胞苷能使老年人急性白血病伴发的动脉粥样硬化消退 2 例报告 [J]. *国外医学: 老年医学分册* 2004, 25(2): 95.
- [6] 何清, 王长谦, 葛恒, 等. 特异性抑制单核细胞中 EMMPRIN 基因表达的 siRNA 筛选和鉴定 [J]. *上海交通大学学报* 2007, 27(6): 681-684.
- [7] Biswas C, Zhang Y, DeCastro R, *et al.* The human tumor cell-derived collagenase stimulatory factor (renamed EMMPRIN) is a member of the immunoglobulin superfamily [J]. *Cancer Res*, 1995, 55(2): 434-439.
- [8] Weyand CM, Younge BR, Goronzy JJ. T cells in arteritis and atherosclerosis [J]. *Curr Opin Lipidol* 2008, 19(5): 469-477.
- [9] Aukrust P, Otterdal K, Yndestad A, *et al.* The complex role of T-cell-based immunity in atherosclerosis [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2008, 10(3): 236-243.
- [10] Koch C, Staffler G, Huttinger R, *et al.* T cell activation-associated epitopes of CD147 in regulation of the T cell response, and their definition by antibody affinity and antigen density [J]. *Int Immunol* 1999, 11(5): 777-786.
- [11] 范冬梅, 杨铭, 贾海荣. 阿糖胞苷上调白血病细胞 CD86 分子及细胞因子表达的研究 [J]. *细胞与分子免疫学杂志* 2008, 24(6): 550-556.
- [12] Pakula R, Melchior A, Denys A, *et al.* Syndecan-1/CD147 association is essential for cyclophilin B-induced activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases and promotion of cell adhesion and chemotaxis [J]. *Glycobiology* 2007, 17(5): 492-503.
- [13] Doniger SW, Salomonis N, Dahlquist KD, *et al.* MAPPFinder: using Gene Ontology and GenMAPP to create a global gene-expression profile from microarray data [J]. *Genome Biol* 2003, 4(1): R7.
- [9] Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, *et al.* Retinoic acid embryopathy [J]. *N Engl J Med* 1985, 313(14): 837-841.
- [10] Danzer E, Schwarz U, Wehrli S, *et al.* Retinoic acid induced myelomeningocele in fetal rats: characterization by histopathological analysis and magnetic resonance imaging [J]. *Exp Neurol* 2005, 194(2): 467-475.
- [11] Danzer E, Kiddoo DA, Redden RA, *et al.* Structural and functional characterization of bladder smooth muscle in fetal rats with retinoic acid-induced myelomeningocele [J]. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007, 292(1): F197-F206.
- [12] Collins MD, Tzimas G, Burgin H, *et al.* Single versus multiple dose administration of all-trans-retinoic acid during organogenesis: differential metabolism and transplacental kinetics in rat and rabbit [J]. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995, 130(1): 9-18.
- [13] Gardner WJ. Hypothesis: overdistention of the neural tube may cause anomalies of non-neural organs [J]. *Teratology* 1980, 22(2): 229-238.
- [14] Seller MJ, Kalousek DK. Neural tube defects: heterogeneity and homogeneity [J]. *Am J Med Genet Suppl* 1986, 2: 77-87.

( 本文编辑 刘璐 )

( 上接第 1053 页 )

- [3] Kitamura M, Ishikawa Y, Moreno-Manzano V, *et al.* Intervention by retinoic acid in oxidative stress-induced apoptosis [J]. *Nephrol Dial Transplant* 2002, 17(9): 84-87.
- [4] Xu Q, Konta T, Kitamura M. Retinoic acid regulation of mesangial cell apoptosis [J]. *Exp Nephrol* 2002, 10(3): 171-175.
- [5] Konta T, Xu Q, Furusu A, *et al.* Selective roles of retinoic acid receptor and retinoid x receptor in the suppression of apoptosis by all-trans-retinoic acid [J]. *J Biol Chem* 2001, 276(16): 12697-12701.
- [6] Moreno-Manzano V, Ishikawa Y, Lucio-Cazana J, *et al.* Suppression of apoptosis by all-trans-retinoic acid. Dual intervention in the c-Jun n-terminal kinase-AP-1 pathway [J]. *J Biol Chem* 1999, 274(29): 20251-20258.
- [7] Leonard L, Horton C, Maden M, *et al.* Anteriorization of CRABP-I expression by retinoic acid in the developing mouse central nervous system and its relationship to teratogenesis [J]. *Dev Biol* 1995, 168(2): 514-528.
- [8] Soprano DR, Soprano KJ. Retinoids as teratogens [J]. *Annu Rev Nutr* 1995, 15: 111-132.

( 本文编辑 刘璐 )