

AMD3100 促进动脉粥样硬化病变与上调炎性因子表达及下调 SDF-1 α /CXCR4 轴有关*

王佐^{1)**} 苏维¹⁾ 周晓峰²⁾ 张凯¹⁾ 李爽¹⁾ 马小峰¹⁾ 姜志胜^{1)**}

(¹⁾ 南华大学心血管疾病研究所, 动脉硬化化学湖南省重点实验室, 衡阳 421001; ²⁾ 青海大学附属医院病理科, 西宁 810001)

摘要 探索 CXCR4 阻断剂 AMD3100 促进 apoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化病变的分子机制。36 只 8 周龄雄性 apoE^{-/-}小鼠随机分为三组: 普食组、高脂组 and AMD3100 组。ELISA 法测血清基质细胞衍生因子 1 α (SDF-1 α)水平, 采用氧化酶法测定 apoE^{-/-}小鼠血清中三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)含量。HE 染色检测 apoE^{-/-}小鼠主动脉根部横切面动脉粥样硬化病变。免疫组织化学检测小鼠胸主动脉 CXCR4 表达。RT-PCR 和 Western blot 分别检测小鼠动脉组织 TNF- α 、NF- κ B mRNA 和蛋白质表达。AMD3100 组小鼠主动脉根部横切面的动脉粥样硬化病变较高脂组严重, AMD3100 组小鼠胸腹主动脉炎症因子 TNF- α 、NF- κ B 的 mRNA 水平和蛋白质表达增高, 但血脂 TG、TC、HDL-C 和 LDL-C 含量与高脂组均无显著性差异。AMD3100 组小鼠外周血 SDF-1 α 水平和动脉壁 CXCR4 表达低于高脂组。结果表明: AMD3100 通过上调炎性因子表达及下调 SDF-1/CXCR4 轴促进 apoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化病变。

关键词 基质细胞衍生因子 1 α , CXCR4, 动脉粥样硬化, AMD3100, 肿瘤坏死因子 α , 核因子 κ B

学科分类号 Q81, R54

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00187

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是引起心脑血管疾病、危害人类健康的头号杀手。炎症学说将 As 的各种病理改变视为动脉慢性炎症的不同阶段, 由单核/巨噬细胞介导的炎症反应可启动一系列炎症反应, 诱导白介素-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、C-反应蛋白、巨噬细胞集落刺激因子等炎症因子大量表达, 促进脂质在动脉壁的沉积, 使 As 不断加剧^[1-2]。基质细胞衍生因子 1 α (stromal cell-derived factor-1 α , SDF-1 α) 与其受体 CXCR4 所组成的 SDF-1 α /CXCR4 轴可能与 As 的形成有关。如 SDF-1 α 在 As 斑块中^[3]、apoE^{-/-}小鼠动脉内膜损伤后再内皮化过程中^[4]、血管移植性 As 斑块中的高表达, SDF-1 α 抗体可减轻其病变程度^[5]。然而, Damás 等^[6]发现, 心绞痛患者尤其是不稳定型心绞痛患者 SDF-1 α 水平显著降低, 外周血单核细胞表面 CXCR4 降低, 高浓度 SDF-1 α 有稳定 As 斑块的作用。我们前期研究发现, AMD3100 有促进 apoE^{-/-}小鼠 As 斑块形成的作用^[7], 并且与抑制其骨髓源性内皮祖细胞增殖、

迁移和黏附有关^[8], 但 AMD3100 是否通过促进炎性因子表达起作用尚不清楚。本研究拟通过检测炎症因子 TNF- α 、NF- κ B 及 SDF-1 α /CXCR4 轴表达来探讨 AMD3100 促进 apoE^{-/-}小鼠 As 病变的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性 apoE^{-/-}小鼠(8 周龄)购自北京大学医学部实验动物中心; AMD3100 购自 Sigma 公司; Trizol 购自 Invitrogen 公司; 逆转录试剂盒(ReverAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit)购于 Promega 公司; SDF-1 α ELISA 试剂盒(R&D System: MCX120);

* 国家自然科学基金资助项目(81070221), 湖南省高校科技创新团队支持计划和湖南省教育厅课题资助项目(07C617)。

** 通讯联系人。

Tel: 0734-8281297, E-mail: smt121101@163.com

收稿日期: 2011-06-11, 接受日期: 2011-09-27

CXCR4 抗体购自 Santa Cruz 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及给药方法. 36 只 8 周龄雄性 apoE^{-/-} 小鼠, 体重(22.5 $\pm$ 2.6) g, 随机分为 3 组, 每组 12 只。① 普食组(正常饲料喂养), ② 高脂组(高脂饲料喂养, PBS 0.1 ml/2 天, 腹腔注射), ③ AMD3100 组(高脂饲料喂养, AMD3100 2.5 mg/kg/2 天, 腹腔注射), 其中的高脂饲料为正常饲料加 0.25%胆固醇和 15%猪油。各组小鼠自由饮水, 每周测小鼠体重依此调整用药, 共喂养 12 周。

1.2.2 血脂水平测定. ApoE^{-/-} 小鼠处死前均禁食过夜, 取各组小鼠新鲜血清, 采用酶法、免疫比浊法运用全自动生化分析仪测定血清中 TG、TC、HDL-C、LDL-C 含量。

1.2.3 ELISA 法检测 SDF-1 α 血清水平. 收集到的外周血肝素抗凝, 1 000 g 离心 15 min, 取上清后于 4℃ 下 10 000 g 离心 10 min, 去除血小板。预先向各反应孔(96 孔板)加入 50 μ l 测定稀释液 RD1-55, 然后将标准品和待测血清各 50 μ l 加入相应反应孔, 封闭板孔。室温下于振荡仪上 500 r/min 孵育 2 h 洗板, 每孔依次加入 100 μ l SDF-1 α 结合物, 封板。室温下于振荡仪上 500 r/min 室温孵育 2 h 洗板, 每孔依次加入 200 μ l 底物溶液, 室温下避光孵育 30 min。加入 50 μ l 终止液, 30 min 内在酶标仪上读取 A₅₄₀、A₅₇₀ 值, 并绘制标准曲线, 然后根据血清样本的 A 值, 计算 SDF-1 α 浓度。

1.2.4 HE 染色检测主动脉粥样硬化 As 病变. 小鼠主动脉根部的连续切片中, 隔 6 张取一张做 HE 染色。程序如下: 石蜡切片 60℃ 烤片 30 min; 二甲苯 I 浸泡 3~5 min; 二甲苯 II 浸泡 3~5 min; 95%乙醇浸泡 3~5 min; 85%乙醇浸泡 3~5 min; 蒸馏水 3~5 min; 苏木素 5 min; 稍水洗后用 1%盐酸水溶液分色数秒钟; 流水冲洗 15 min 以上; 0.5%伊红乙醇溶液 1 min; 85%乙醇浸泡数秒钟; 95%乙醇浸泡数秒钟; 100%乙醇 I 浸泡 1~3 min; 100%乙醇 II 浸泡 1~3 min; 二甲苯 I 浸泡 5 min; 二甲苯 II 浸泡 5 min; 中性树胶封片。病理组织实时摄像系统下采图, 运用多功能真彩色病理图像分析软件分析各组织切片的斑块面积, 每个组织共取 5 个切片, 取均值。

1.2.5 RT-PCR 检测小鼠主动脉 TNF- α 、NF- κ B 水平. TRIZOL 试剂提取小鼠动脉组织总 RNA, 溶于无 RNase 水中, 紫外分光光度计测定 A₂₆₀/A₂₈₀

的比值在 1.8~2.0 之间。取总 RNA 2 μ g, 用 Promega 公司逆转录试剂盒合成 cDNA, 再取逆转录产物 1.0 μ l 进行 PCR 循环。鼠 TNF- α 引物序列为: 上游 5' ACCAGGAGAAAGTCAACC 3', 下游 5' TTCCCTTCACAGAGCAAT 3', 扩增片段长度为 221 bp。PCR 反应条件为: 94℃ 5 min 预变性, 94℃ 50 s 变性, 55℃ 30 s 退火, 72℃ 30 s 延伸, 34 个循环, 72℃ 10 min 继续延伸。鼠 NF- κ B 其引物序列为: 上游 5' GGGACTATGACTTGAATGC 3', 下游 5' CGTTTTCCTGGATACTCT 3', 产物 473 bp。PCR 反应条件同上。反应结束后, 取 RT-PCR 产物在 1.2%琼脂糖凝胶中电泳, 点样量均为 5 μ l, 溴化乙锭染色。电泳条带采用 UVP 型凝胶图像分析系统做积分吸光度测定和分析, 以各组目的基因与内参照基因的 RT-PCR 扩增 DNA 片段的吸光度值减去背景值的比值, 来比较待测基因的 mRNA 水平差异。

1.2.6 Western blot 检测 TNF- α 、NF- κ B 蛋白表达. 用三去污裂解缓冲液将小鼠动脉组织裂解, 4℃ 离心 10 min, 弃除沉淀, BCA 法进行蛋白质定量, 取 50 μ g 蛋白质加入 5 $\times$ SDS 凝胶加样缓冲液中, 100℃ 加热 10 min 使蛋白质变性。用 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳(积层胶 80 mV, 分离胶 120 mV), 电转移(60 mA 1 h)至 PDVF 膜, 丽春红染色观察转移效果, 并确定蛋白质分子质量标准位置。5%脱脂牛奶 4℃ 封闭过夜, 加入稀释的一抗(羊多克隆抗体 CXCR4 1:500、小鼠单克隆抗体 β -actin 1:1 000、兔多克隆抗体 TNF- α 1:500、兔多克隆抗体 NF- κ B 1:500), 4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 15 min $\times$ 3 次, 加入稀释的二抗(辣根过氧化物酶标记兔抗羊 IgG 1:1 000、羊抗小鼠 IgG 1:2 000、羊抗兔 IgG 1:2 000), 室温孵育 1 h, TBST 洗 15 min $\times$ 3 次, 蛋白质印迹荧光检测试剂盒显示于 X 光片。结果用 Labwork 凝胶图像分析系统对胶片扫描, 目的蛋白各组的面积灰度值减去背景灰度值与经过同样处理的 β -actin 灰度值的比值进行比较, 以高脂组比值为 100%与实验组进行比较和半定量分析。

1.2.7 免疫组织化学图像分析. HMIAS2000 高清晰度彩色医学图文分析系统对染色强度进行定量分析。随机选取 3 只/组小鼠胸主动脉行石蜡切片, 每只小鼠选取 3 张非连续性免疫组化染色切片, 每张切片于 40 倍物镜下随机抽测 5 个视野, 每例标本共 15 个视野。测定目标平均灰度、标定空白处

平均灰度和目标面积, 依据公式计算目标平均吸光度(mean optical density, MOD). 目标平均吸光度=lg 标定空白处平均灰度 / 目标平均灰度.

2 结 果

2.1 ApoE^{-/-}小鼠主动脉根部横切面 As 病变分析

AMD3100 组小鼠 As 各期病变均可见, 但多为

粥样硬化期病变, 内膜明显增厚(图 1), 经 HE 染色后计算斑块截面面积占整个血管管腔面积的百分比, 普食组为(12.5±1.3)%, 高脂组为(26.8±2.5)%, AMD3100 组为(37.2 ± 3.6)%. 与高脂组相比, AMD3100 组斑块截面面积增加了 38.8%($P < 0.05$, $n=6$).

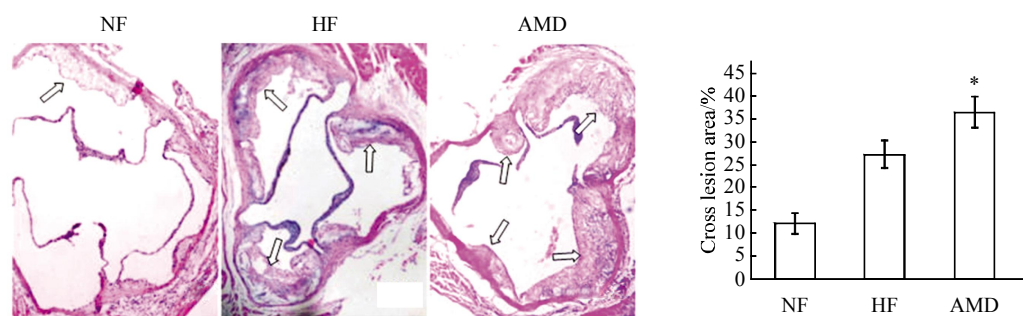


Fig. 1 Effect of AMD3100 on aortic sinus cross section lesion of apoE^{-/-} mice

Hematoxylin/Eosin dyeing of aortic sinus cross section (10×). HF: High fat group, aggregation of many foam cells below local intima, intima hyperplasy (arrow); AMD: AMD3100 group, 4 larger atheromatous plaque and plaque intrude lumina (arrow), lumina narrow obviously; NF: Normal food group, local intima swell up, fatty streak (arrow); * $P < 0.01$, vs HF, $n = 6$.

2.2 AMD3100 对 apoE^{-/-}小鼠血脂水平的影响

高脂组小鼠血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 水平平均高于普食组, 而 AMD3100 组与高脂组相比差

异无显著性, 说明 AMD3100 对 apoE^{-/-}小鼠血脂水平无影响(表 1).

Table 1 Effect of AMD3100 on serum lipid of apoE^{-/-} mice

Group	($\bar{x} \pm s$, mol/L)			
	TC	TG	HDL-C	LDL-C
NF	10.199 ± 1.063	0.376 ± 0.049	5.945 ± 0.638	4.184 ± 0.812
HF	17.973 ± 3.536*	0.863 ± 0.084*	10.364 ± 1.575*	7.436 ± 2.271*
AMD	16.920 ± 3.154	0.912 ± 0.113	9.916 ± 1.556	6.822 ± 2.064

NF: Normal food group; HF: High fat group; AMD: AMD3100 group; * $P < 0.05$, vs NF, $n=6$, serum lipid was higher.

2.3 AMD3100 对主动脉壁炎性因子 NF-κB 表达的影响

RT-PCR 检测了各组动脉 NF-κB mRNA 表达水平(图 2). 各组的灰度比值分别为: 普食组(0.521 ± 0.043), AMD3100 组(0.879 ± 0.088), 高脂组(0.656 ± 0.075); AMD3100 组比高脂组增加了 33.9% ($P < 0.01$, $n=3$), 高脂组比普食组增加了 25.9% ($P < 0.01$, $n=3$). Western blot 检测了各组动

脉 NF-κB 的蛋白质表达水平(图 2). 各组小鼠血管组织 NF-κB 蛋白表达的吸光度比值分别为: 普食组(0.517 ± 0.025), AMD3100 组(0.868 ± 0.036), 高脂组(0.695 ± 0.027). AMD3100 组 NF-κB 蛋白表达水平比高脂组增加了 25.2% ($P < 0.05$, $n=3$), 提示 AMD3100 增加 apoE^{-/-}小鼠动脉组织 NF-κB 表达水平.

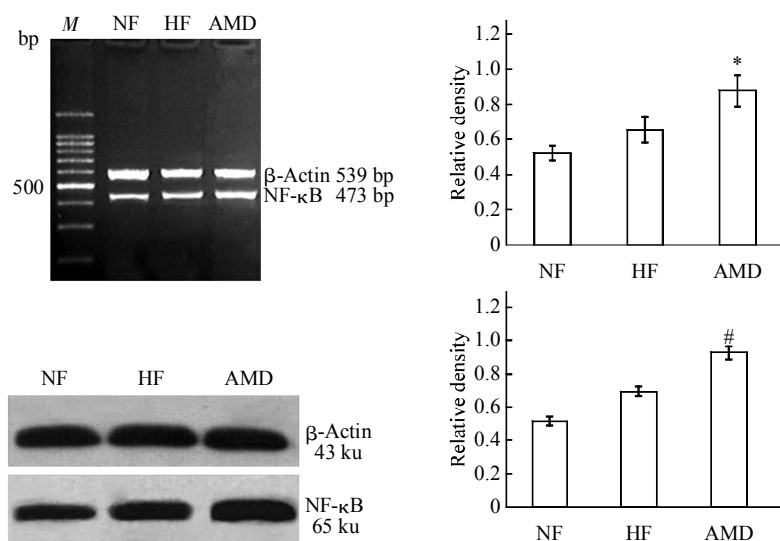


Fig. 2 The effect of AMD3100 on NF-κB mRNA level and protein expression

NF-κB mRNA expression increased remarkably in AMD compared with HF (0.879 ± 0.028 vs 0.656 ± 0.025 , $*P < 0.01$, $n=3$); NF-κB protein level increased remarkably in AMD compared with HF (0.868 ± 0.036 vs 0.695 ± 0.027 , $#P < 0.05$, $n=3$). M: DNA marker; NF: Normal food group; HF: High fat group; AMD: AMD3100 group.

2.4 AMD3100 对主动脉壁炎症因子 TNF- α 表达的影响

RT-PCR 检测了各组动脉组织 TNF- α mRNA 的表达水平(图 3). 各组灰度比值分别为: 普食组(0.507 ± 0.072), 高脂组(0.651 ± 0.085), AMD3100 组(0.934 ± 0.152); AMD3100 组 TNF- α mRNA 表达水平比高脂组增加了 43.47% ($P < 0.05$, $n=3$), 高脂组比普食组增加了 26.19% ($P < 0.05$, $n=3$).

Western blot 检测了各组小鼠动脉组织中 TNF- α 蛋白的表达水平(图 3). 各组光密度比值分别为: 普食组(0.496 ± 0.075), 高脂组(0.615 ± 0.105), AMD3100 组(0.806 ± 0.122). AMD3100 组 TNF- α 蛋白表达水平比高脂组增加了 31.16% ($P < 0.05$, $n=3$), 提示 AMD3100 增加了 apoE^{-/-}小鼠动脉组织 TNF- α 表达水平.

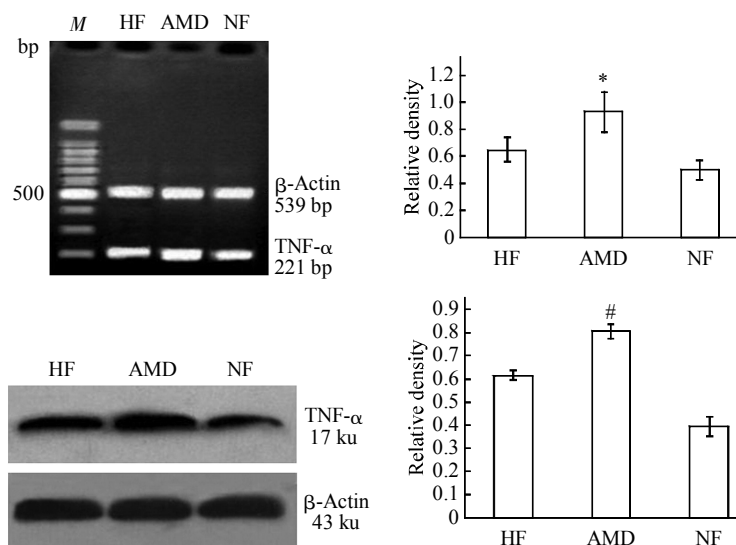


Fig. 3 The effect of AMD3100 on TNF- α mRNA level and protein expression

TNF- α mRNA increased remarkably in AMD compared with HF (0.651 ± 0.023 vs 0.934 ± 0.092 , $n=3$, $*P < 0.01$); TNF- α protein level increased remarkably in AMD vs HF (0.615 ± 0.021 vs 0.806 ± 0.031 , $n=3$, $#P < 0.01$). M: DNA marker; NF: Normal food group; HF: High fat group; AMD: AMD3100 group.

2.5 AMD3100 对主动脉壁 CXCR4 的影响

高脂组小鼠血管中膜和内膜中平滑肌细胞胞浆内 CXCR4 高度表达(图 4), 着色部位呈棕褐色, 目标平均吸光度值(MOD)为(71 ± 10); AMD3100 组主动脉内中膜中等程度棕黄色颗粒(图 4), 目标 MOD 为(58 ± 8), 与高脂组相比, 小鼠动脉壁 CXCR4 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$, $n = 5$). 普食组小鼠主动脉见少量的棕黄色颗粒(图 4), 目标 MOD 为(33 ± 5), 其 CXCR4 表达水平低于 AMD3100 组($P < 0.05$).

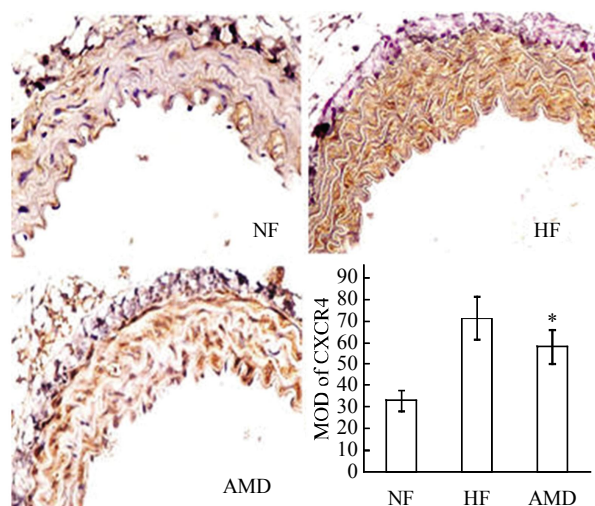


Fig. 4 Effect of AMD3100 on CXCR4 expression on apoE^{-/-} mice aorta wall

Immunohistochemistry detected CXCR4 expression on aorta wall (SABC, 40×). NF: Normal food group; HF: High fat group; AMD: AMD3100 group; * $P < 0.05$, vs HF, $n = 5$.

2.6 AMD3100 对 apoE^{-/-}小鼠血清 SDF-1α 水平的影响

ELISA 法检测各组小鼠血清 SDF-1α 水平 (μg/L), 高脂组小鼠血清 SDF-1α 水平显著低于普食组 (3.230 ± 0.157 vs 3.585 ± 0.243 , $P < 0.05$, $n = 6$). AMD3100 组 SDF-1α 血清水平 (2.955 ± 0.185) 明显低于高脂组 ($P < 0.05$, $n = 6$), 即 CXCR4 阻断剂 AMD3100 降低 apoE^{-/-}小鼠循环 SDF-1α 水平(图 5).

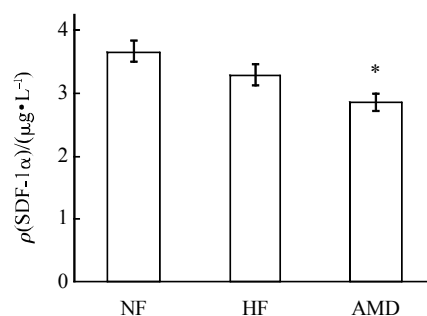


Fig. 5 Effect of AMD3100 on SDF-1α serum level of apoE^{-/-} mice

NF: Normal food group; HF: High fat group; AMD: AMD3100 group; * $P < 0.05$, vs HF, $n = 6$.

3 讨 论

As 是一种炎症 - 增生性疾病, 斑块的形成和进展与炎症反应密切相关^[9-11]. 关于 SDF-1α/CXCR4 与炎症因子及炎症的关系, 存在不同甚至相反的证据. 首先, 有研究表明 SDF-1α/CXCR4 可促进 As 过程中炎症因子表达. 如 SDF-1α 可活化并引起血小板聚集^[3], 并趋化其进入病灶而促进血管壁的炎症反应^[12-13], 新生内膜中的平滑肌细胞可分泌 SDF-1α, SDF-1α 趋化 T 细胞^[14]、单核细胞^[15]进入血管壁, 并刺激 T 细胞产生细胞因子 IL-2、INF-γ^[16]参与 As 形成. 然而 As 病变本身就是一个复杂的损伤和修复持续共同存在的慢性炎症反应过程. SDF-1α/CXCR4 虽然参与了 As 的炎症反应, 但初期的炎症反应本身就是机体的一种自我保护反应, 其可能并不参与长期的慢性炎症反应. Poznansky 等^[17]发现, SDF-1α 可以逆转抗原诱导的 T 细胞向炎症部位募集. Damás 等^[18]发现, 高浓度 SDF-1α 可通过降低不稳定心绞痛患者外周血单核细胞的 IL-8 和 MCP-1 水平发挥抗炎特性. 其次, 炎症因子可以抑制 SDF-1 和 / 或 CXCR4 的表达. 如促炎因子 TNF-α 和 IFN-γ 可抑制人脐静脉内皮细胞整个细胞周期内 SDF-1 和 CXCR4 的表达^[18]. TNF-α 可下调初级星形胶质细胞上 CXCR4 表达^[19], 活化的巨噬细胞分泌的 IL-1 和 TNF-α 可减少人成纤维细胞 SDF-1α 表达, 在小鼠发生急性炎症的皮肤

损伤处 SDF-1 α mRNA 的表达降低^[20]。TNF- α 可抑制骨髓中 SDF-1 α mRNA 和蛋白质水平破坏骨髓微环境, 通过 IL-1 β 扩大骨髓粒细胞含量, 从而促进 B 淋巴细胞入循环^[20]。我们发现炎症因子 TNF- α 和 NF- κ B 的表达在 AMD3100 处理组小鼠胸腹主动脉的表达均升高, 提示 SDF-1 α /CXCR4 可减少 As 过程中炎症因子表达。

本研究显示 AMD3100 明显降低高脂高胆固醇饲养的 apoE^{-/-}小鼠 SDF-1 α 水平, As 病变的严重程度与血浆 SDF-1 α 水平有负相关趋势, 这与临床研究发现不稳定型心绞痛患者血浆 SDF-1 α 水平比稳定型患者水平较低相一致。其可能原因: a. 动脉内皮损伤开始阶段, 受损的内皮细胞、内膜中的平滑肌细胞和巨噬细胞、活化的血小板等都可分泌 SDF-1 α , 使得 As 斑块中 SDF-1 α 表达增加并进入血液循环, 从而使得循环 SDF-1 α 水平增加, 但随着病变发展, 当出现斑块破裂、血栓形成、斑块内出血时, 会引起全身反应, 如氧化应激可引起 VEGF 表达增加, 刺激 CXCR4 阳性骨髓细胞动员入血, 并且循环 SDF-1 α 水平升高也可动员骨髓细胞, 骨髓细胞表达的 CXCR4 与 SDF-1 α 相互作用, 消耗大量 SDF-1 α , 从而降低循环 SDF-1 α 水平。b. As 病变严重时大量炎症因子表达增高也可能降低 SDF-1 α 水平。

本实验在高脂高胆固醇饲养的 apoE^{-/-}小鼠模型上发现, AMD3100 组小鼠主动脉 As 病变加重, 主动脉炎症因子 TNF- α 、NF- κ B 表达水平升高, 由此推测, 长期应用 AMD3100 加重 As 病变程度与其增加炎症因子表达有关。由于 AMD3100 通过阻断 SDF-1 α /CXCR4 轴而加重 As 病变, 提示 SDF-1 α /CXCR4 对 As 发生发展具有保护作用。进一步探明 AMD3100 对其他促炎症因子和抑炎因子的影响将有助于理解和总结 SDF-1 α /CXCR4 对 As 保护作用的机制。

参 考 文 献

- [1] Steinberg D. Atherogenesis in perspective: Hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat Med*, 2002, **8** (11): 1211-1217
- [2] Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2002, **420** (6): 868-874
- [3] Abi-Younes S, Sauty A, Mach F, *et al.* The stromal cell-derived factor-1 chemokine is a potent platelet agonist highly expressed in atherosclerotic plaques. *Circ Res*, 1999, **86**(2): 131-138
- [4] Schober A, Knarren S, Lietz M, *et al.* Crucial role of stromal cell-derived factor-1 α in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 2003, **108** (2): 491-497
- [5] Sakihama H, Masunaga T, Yamashita K, *et al.* Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 interaction is critical for development of transplant arteriosclerosis. *Circulation*, 2004, **110**(18): 2924-2930
- [6] Dams J K, Waehre T, Yndestad A, *et al.* Stromal cell derived factor-1 in unstable angina potential antiinflammatory and matrix stabilizing effects. *Circulation*, 2002, **106**(1): 36-42
- [7] 周晓峰, 王 佐. AMD3100 促进载脂蛋白 E^{-/-}小鼠动脉粥样硬化斑块形成. *中国动脉硬化杂志*, 2008, **16**(6): 445-448
Zhou X F, Wang Z, Chin J *Arteriosclerosis*, 2008, **16**(6): 445-448
- [8] 王 佐, 周晓峰, 王 仁, 等. AMD3100 对 apoE^{-/-}小鼠骨髓源性内皮细胞增殖、迁移和黏附的影响. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(7): 807-813
Wang Z, Zhou X F, Wang R, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(7): 807-813
- [9] Weintraub W S, Harrison D G. C reactive protein, inflammation and atherosclerosis: Do we really understand it yet?. *Eur Heart J*, 2000, **21**(12): 958-960
- [10] Belton O, Byrne D, Kearney D, *et al.* Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation*, 2000, **102**(8): 840-845
- [11] Grimm S, Baeruerle P A. The inducible transcription factor NF- κ B structure function relationship of its protein subunits. *Biochem J*, 1993, **290**(2): 297-308
- [12] Massberg S, Konrad I, Schürzinger K, *et al.* Platelets secrete stromal cell-derived factor 1 α and recruit bone marrow-derived progenitor cells to arterial thrombi *in vivo*. *J Exper Med*, 2006, **203**(5): 1221-1233
- [13] Gear A R, Camerini D. Platelet chemokines and chemokines receptors: Linking hemostasis, inflammation and host defence. *Microcirculation*, 2003, **10**(3-4): 335-350
- [14] Zeiffer U, Schober A, Lietz M, *et al.* Neointimal Smooth muscle cells display a proinflammatory phenotype resulting in increased leukocyte recruitment mediated by p-selectin and chemokines. *Circ Res*, 2004, **94**(6): 776-784
- [15] Gupta S K, Pillarisetti K, Lysko P G. Modulation of CXCR4 expression and SDF-1 α functional activity during differentiation of human monocytes and macrophages. *J Leukoc Biol*, 1999, **66**(1): 135-143
- [16] Han K H, Hong K H, Ko J, *et al.* Lysophosphatidylcholine up-regulates CXCR4 chemokine receptor expression in human CD4 T cells. *J Leukoc Biol*, 2004, **76**(1): 195-202
- [17] Poznansky M C, Olszak I T, Foxall R, *et al.* Active movement of T cells away from a chemokine. *Nat Med*, 2000, **6**(5): 543-548
- [18] Salvucci O, Basik M, Yao L, *et al.* Evidence for the involvement of SDF-1 and CXCR4 in the disruption of endothelial cell-branching morphogenesis and angiogenesis by TNF- α and IFN- γ . *J Leukoc Biol*, 2004, **76**(1): 217-226
- [19] Han Y, Wang J, He T, *et al.* TNF- α down-regulates CXCR4 expression in primary astrocytes. *Brain Res*, 2001, **888**(1): 1-10
- [20] Ueda Y, Yang K, Foster S J, *et al.* Inflammation controls B lymphopoiesis by regulating chemokine CXCL12 expression. *J Exp Med*, 2004, **199**(1): 47-58

AMD3100 Aggravates Atherogenesis by Up-regulating Inflammatory Factor Expression and Down-regulating SDF-1/CXCR4 Axis*

WANG Zuo^{1)**}, SU Wei¹⁾, ZHOU Xiao-Feng²⁾, ZHANG Kai¹⁾, LI Shuang¹⁾, MA Xiao-Feng¹⁾, JIANG Zhi-Sheng^{1)**}

¹⁾ Institute of Cardiovascular Research, Key Laboratory for Arteriosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang 421001, China;

²⁾ Department of Pathology, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, China)

Abstract To study the effect of CXCR4 antagonist AMD3100 on the atherosclerotic lesion, the expression of TNF- α and NF- κ B and SDF-1 α /CXCR4, so as to approach the specific role and possible mechanisms of SDF-1 α /CXCR4 on atherosclerosis. 36 male apoE^{-/-} mice, 8 weeks old, randomly divided into three groups: ① normal food group, ② high fat group, ③ AMD3100 group. Animals from high fat group and AMD3100 group were fed with western food which including 15% fat and 0.25% cholesterol. After feeding 12 weeks, all mice were anesthetized by 0.2~0.3 ml Urethane (20%) and removed eyeball in order to obtain blood preparation. Serum lever of SDF-1 α was measured by ELISA. Serum triglyceride (TG), total cholesterol (TC), and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were determined by commercially enzymatic methods. The Hematoxylin/Eosin dyeing of paraffin section was used to detect the area of atherosclerotic plaque of apoE^{-/-} mice aortic root transaction. The expression of CXCR4, TNF- α and NF- κ B was analyzed by real time RT-PCR and Western blot, respectively. As a result, AMD3100 treatment resulted in a significant increase of atherosclerotic lesion area and the expression of TNF- α and NF- κ B in apoE^{-/-} mice. Serum TG, TC, HDL-C and LDL-C concentrations were not markedly changed. AMD3100 reduced SDF-1 α serum lever and CXCR4 expression on artery wall. It can be concluded that, atherosclerotic lesions in apoE^{-/-} mice were aggravated by long term administration of CXCR4 antagonist AMD3100. Possible mechanisms of this action for AMD3100 are associated with the up-regulation pro-inflammatory factors TNF- α and NF- κ B and down-regulation SDF-1 α /CXCR4 axis.

Key words SDF-1 α , CXCR4, atherosclerosis, AMD3100, TNF- α , NF- κ B

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00187

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81070221), Science and Technology Innovative Research Team in Higher Educational Institutions of Hunan Province, Educational Foundation of Hunan Province (07C617).

**Corresponding author.

Tel: 86-734-8281297, E-mail: smt121101@163.com

Received: June 11, 2011 Accepted: September 27, 2011