

## 矢车菊素-3-葡萄糖苷抑制血小板趋化因子介导的 THP-1细胞迁移

陈彦球<sup>1</sup>, 张献丹<sup>2</sup>, 覃楠<sup>3</sup>, 李卿<sup>4,5</sup>, 杨燕<sup>4,5</sup>

(1.广州市妇女儿童医疗中心,广东广州 510623;2.广西壮族自治区人民医院营养科,广西 南宁 530000;3.广州医科大学附属第二医院,广东广州 510260;4.广东省膳食与健康重点实验室,广东广州 510080;5.中山大学公共卫生学院营养学系,广东广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨花色苷单体矢车菊素-3-葡萄糖苷(Cy-3-g)对血小板分泌的炎症相关因子,及对血小板趋化因子诱导的单核细胞迁移的影响。【方法】健康人纯化血小板分别与不同浓度 Cy-3-g(0、0.5、5、50 μmol/L)孵育,酶联免疫吸附法(ELISA)检测血小板分泌的上清液中 TGF-β1、β-TG、CCL5 的水平;不同浓度 Cy-3-g 与健康人外周静脉血共同孵育 60 min,流式细胞仪检测白细胞表面的 CCR5 水平;使用 Calcein AM 标记 THP-1 细胞,然后与不同浓度 Cy-3-g 孵育后的纯化血小板上清共同作用 120 min,于显微镜下观察细胞迁移情况;将 THP-1 细胞株分别与不同浓度 Cy-3-g 和 CCR5 抑制剂 Maraviroc 干预 60 min,然后和重组蛋白分子 CCL5(100 nmol/L)共同作用 120 min,显微镜观察细胞迁移情况。【结果】与对照组相比,5、50 μmol/L 的 Cy-3-g 能显著抑制纯化血小板分泌的 TGF-β1、β-TG、CCL5 与白细胞表面 CCR5 水平( $P<0.05$ );同时,5 μmol/L 和 50 μmol/L 的 Cy-3-g 能显著抑制血小板上清诱导的 THP-1 细胞的迁移( $P<0.05$ );Cy-3-g 也可显著抑制重组蛋白分子 CCL5 诱导的 THP-1 细胞的迁移( $P<0.05$ )。【结论】花色苷 Cy-3-g 可以在体外通过抑制 CCL5/CCR5 介导的 THP-1 细胞迁移而有效抑制炎症,为花色苷抗炎及防治心血管疾病提供新的思路。

**关键词:**花色苷;血小板趋化因子;THP-1 细胞;CCL5;CCR5

**中图分类号:**R151.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2018)01-0041-07

## Cyanidin-3-o-β-glucoside Inhibits THP-1 Cells Migration Mediated by Platelet Derived Chemotactic Factor

CHEN Yan-Qiu<sup>1</sup>, ZHANG Xian-Dan<sup>2</sup>, QIN Nan<sup>3</sup>, LI Qing<sup>4,5</sup>, YANG Yan<sup>4,5</sup>

(1.Guangzhou Women And Children's Medical Center, Guangzhou 510623, China; 2. Nutritional Department of The People's Hospital of Guangxi Autonomous Region, Nanning 530000 China; 3.The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, 510260, China; 4.Guangdong Provincial Key Laboratory of Food, Nutrition, and Health, Guangzhou; 5.Department of Nutrition, School of Public Health, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

Corresponding to: YANG Yan, E-mail: yangyan3@mail.sysu.edu.cn

**Abstract:** 【Objective】To evaluate the effects of anthocyanin cyanidin-3-o-β-glucoside (Cy-3-g) on monocyte migration mediated by platelet derived factors in vitro. 【Methods】Thrombin-activated human gel-filtered platelets were incubated with different concentrations (0, 0.5, 5 or 50 μmol/L) of Cy-3-g. The level of TGF-β1, β-TG, CCL5 in platelet supernatant was determined by ELISA. The peripheral venous blood from healthy volunteers were incubated with different concentrations of Cy-3-g. The expression of CCR5 on leukocytes was detected by flow cytometer. Calcein AM labeled THP-1 cells were incubated with the releasates of Cy-3-g-treated gel-filtered platelets for 120 min, and then the number of the THP-1 cells were counted by a microscope. Moreover, THP-1 cells were pre-incubated with different concentrations of Cy-3-g with or without CCR5 inhibitor maraviroc (200 μmol/L) for 60 min, then treated with recombinant CCL5 (100 nmol/L) for 120

收稿日期:2017-11-03

基金项目:国家自然科学基金(81573145, No.81372978);广东省科技计划项目(2015A050502020, 2015A030313117)

作者简介:陈彦球,博士,副主任医师, E-mail: chenylq2014@163.com;杨燕,通信作者: E-mail: yangyan3@mail.sysu.edu.cn

min. The number of the THP-1 cells were counted as well. 【Results】 Cy-3-g significantly inhibited platelet TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ -TG, CCL5 secretion and decreased CCR5 expression of leukocytes compared with the control ( $P<0.05$ ). Moreover, the significant inhibitory effects of Cy-3-g on THP-1 cell migration toward the releasates of Cy-3-g-treated platelets were also observed ( $P<0.05$ ). In addition, THP-1 cell migration toward recombinant CCL5 was significantly suppressed by Cy-3-g. 【Conclusions】 Anthocyanin Cy-3-g inhibited inflammation of atherosclerosis by platelet TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ -TG, CCL5 secretion and CCL5-mediated monocyte migration. Our results provided new ideas for prevention and treatment of atherosclerosis.

**Key words:** anthocyanin; platelet chemokines; THP-1; CCL5; CCR5

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(1):41-47]

血小板作为一种多功能的细胞,在动脉粥样硬化的发生、发展等全过程中都发挥重要作用。血小板在活化之后分泌大量的细胞因子和趋化因子,如 $\beta$ -TG、TGF- $\beta$ 1、CCL5等,从而与白细胞、内皮细胞和血管平滑肌细胞等多种细胞相互作用,诱导白细胞活化、黏附、迁移以及血小板-白细胞聚合物的形成,促进炎症细胞招募至炎症病灶处的内皮细胞表面,参与血管炎症的病理过程<sup>[1-2]</sup>。大量证据表明血小板趋化因子在炎症反应中起重要作用,与动脉粥样硬化的发生发展关系密切。其中C-C类趋化因子配体5(C-C chemokine ligand 5, CCL5)主要来源于血小板,但在T细胞等其他细胞也有少量分泌<sup>[3-5]</sup>。而C-C类趋化因子受体5(C-C chemokine receptor 5, CCR5)是主要表达于单核细胞和巨噬细胞表面的一种受体,在与血小板趋化因子CCL5特异性结合后,介导单核细胞的定向迁移以及黏附,并且可以促进巨噬细胞泡沫化,参与炎症及动脉斑块的形成<sup>[6]</sup>。花色苷是广泛存在于天然植物中的一类黄酮类植物化合物,也是一种水溶性的天然色素,在一些紫红色或者黑色等深色植物中含量十分丰富。矢车菊素-3-葡萄糖苷(Cyanidin-3-glucoside, Cy-3-g)是花色苷中的一种重要单体<sup>[7-8]</sup>。研究发现,花色苷及其提取物可以降低心血管疾病的发病风险,与其抗炎作用密切相关。在我们的前期人群研究中,花色苷显著降低血小板相关炎症因子<sup>[9]</sup>。本研究将以血小板趋化因子CCL5作为切入点,在体外探讨花色苷对血小板分泌的细胞因子、白细胞趋化因子受体,以及血小板与白细胞之间相互作用的影响,将为植物化学物花色苷抗炎抗动脉粥样硬化提供新的理论与实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 健康志愿者

于中山大学校内招募了16名健康志愿者(男性8人,女性8人)。健康志愿者要求至少2周以内未服用任何抗凝或抗血小板药物,未摄入富含花色苷的水果、蔬菜和果汁饮料等,以及无嗜酒、吸烟等习惯。所有志愿者均对试验方式知情且签署知情同意书。

### 1.2 药物和试剂

矢车菊素-3-葡萄糖苷(Cy-3-g)购自挪威 Polyphenol AS公司; $\beta$ -TG ELISA 检测试剂盒购自上海蓝基公司;TGF- $\beta$ 1 ELISA 检测试剂盒购自 R&D Systems;CXCL5 ELISA 检测试剂盒购自 Millipore公司;抗人 CCR5 APC、小鼠 IgG1 K 同种型对照 APC 均购自 eBioscience 公司;凝血酶购自 Sigma 公司;重组人 RANTES(CCL5)购自 PeproTech 公司;人 CCR5 抗体购自 R&D Systems 公司;Maraviroc 购自 MedChem Express 公司;R/MINI-1640 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司;Transwell 小室购自 Millipore 公司;酶标仪购自 Bio-Tek instrument Inc;Gallios 流式细胞仪购自 Beckman 公司;POLARstar OPTIMA 荧光酶标仪购自 BMG 公司。

### 1.3 纯化血小板分泌的 $\beta$ -TG、TGF- $\beta$ 1的水平检测

1.3.1 纯化血小板的制备 采用静脉穿刺抽取健康志愿者外周静脉血 10 mL 于 ACD 抗凝管中。将采集的全血以 1 000 r/min( $r=8.5$  cm)转速室温离心 7 min,上清转移至新的 EP 管中,得到富血小板血浆(Platelet Rich Plasma, PRP)。再将 PRP 于

Sepharose 2B 凝胶过滤系统过滤后得到纯化血小板。

1.3.2  $\beta$ -TG、TGF- $\beta$ 1 的水平检测 分别用终浓度为0、0.5、5、50  $\mu\text{mol/L}$ 的Cy-3-g干预血小板,在37  $^{\circ}\text{C}$ 作用60 min后加入终浓度为0.5 U/mL的Thrombin和1 mmol/L的 $\text{Ca}^{2+}$ 激活纯化血小板5 min,然后放于冰上终止反应。在4  $^{\circ}\text{C}$ ,转速为12 000 r/min条件下(离心半径 $r=8.5$  cm)进行离心15 min,收集血小板分泌的上清液。用ELISA试剂盒检测不同浓度的花色苷干预后血小板分泌的上清液中 $\beta$ -TG、TGF- $\beta$ 1的水平。

#### 1.4 纯化血小板分泌的CCL5的水平检测

分别用终浓度为0、0.5、5、50  $\mu\text{mol/L}$ 的Cy-3-g干预纯化的血小板,在37  $^{\circ}\text{C}$ 作用60 min后加入终浓度为0.5 U/mL的Thrombin和1 mmol/L的 $\text{Ca}^{2+}$ 激活纯化血小板5 min,然后放于冰上终止反应。在4  $^{\circ}\text{C}$ ,转速为12 000 r/min的条件下进行离心15 min,收集血小板分泌的上清液。用ELISA试剂盒检测不同浓度的花色苷干预后血小板分泌的上清液中CCL5的水平。

#### 1.5 健康人白细胞上CCR5表达的检测

收集健康志愿者外周静脉血于ACD抗凝管中。取50  $\mu\text{L}$ 的全血于流式管中,各管分别加入不同浓度的Cy-3-g。孵育60 min后,加入终浓度为100  $\mu\text{mol/L}$ 的ADP激活10 min,加入10 g/L多聚甲醛溶液固定30 min。分别加CCR5的流式抗体以及相应的同型对照抗体后,孵育20 min。后加入红细胞裂解液作用15 min。1 700 r/min,加速度1,25  $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min后,去上清。每管加入PBS再离心10 min。去上清,再加入PBS重悬,上机。采用Gallios十色流式细胞仪上机检测。

#### 1.6 血小板分泌物诱导的THP-1细胞的迁移

1.6.1 血小板分泌上清液的制备 将纯化血小板与不同终浓度Cy-3-g(0、0.5、5、50  $\mu\text{mol/L}$ )孵育60 min。用0.5 U/mL的凝血酶和1 mmol/L的 $\text{Ca}^{2+}$ 激活纯化血小板5 min后放于冰上终止反应。离心收集活化血小板分泌的上清液。

1.6.2 THP-1细胞的培养 人单核细胞株THP-1用含体积分数90%的R/MINI-1640和10%胎牛血清的完全培养在37  $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数5%  $\text{CO}_2$ 、湿度为95%的培养箱中进行培养。

1.6.3 THP-1细胞的迁移实验 THP-1细胞用10  $\mu\text{mol/L}$ 的Calcein AM进行标记30 min。离心后

弃上清。加入PBS溶液,再离心去上清,彻底洗掉多余的Calcein AM。各取100  $\mu\text{L}$ 的THP-1细胞于Transwell小室中,下室加入600  $\mu\text{L}$ 的纯化血小板分泌的上清液,37  $^{\circ}\text{C}$ 共同作用120 min。分别收集下室中的液体,在荧光酶标仪上检测荧光强度。同时用结晶紫溶液对小室膜进行染色,在显微镜下随机选5个视野,计数迁移到膜上的细胞数。

#### 1.7 CCL5诱导的THP-1细胞的迁移

将THP-1细胞与不同终浓度的Cy-3-g和200  $\mu\text{mol/L}$ 的CCR5的抑制剂Maraviroc共同孵育120 min。将THP-1细胞用10  $\mu\text{mol/L}$ 的Calcein AM进行标记,洗掉多余的Calcein AM。各取100  $\mu\text{L}$ 的THP-1细胞于Transwell小室中,下室加入600  $\mu\text{L}$ 的终浓度为100 nmol/L的CCL5,37  $^{\circ}\text{C}$ 共同作用120 min。分别收集下室中的液体,在荧光酶标仪上检测荧光强度。同时用结晶紫溶液对小室膜进行染色,在显微镜下随机选5个视野,计数迁移到膜上的细胞数。

#### 1.8 数据分析

所有的数据统计分析均采用SPSS 20.0软件进行。多组计量资料采用单因素方差分析(ANOVA),多组比较有统计学意义后采用Dunnett's *t*检验, $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

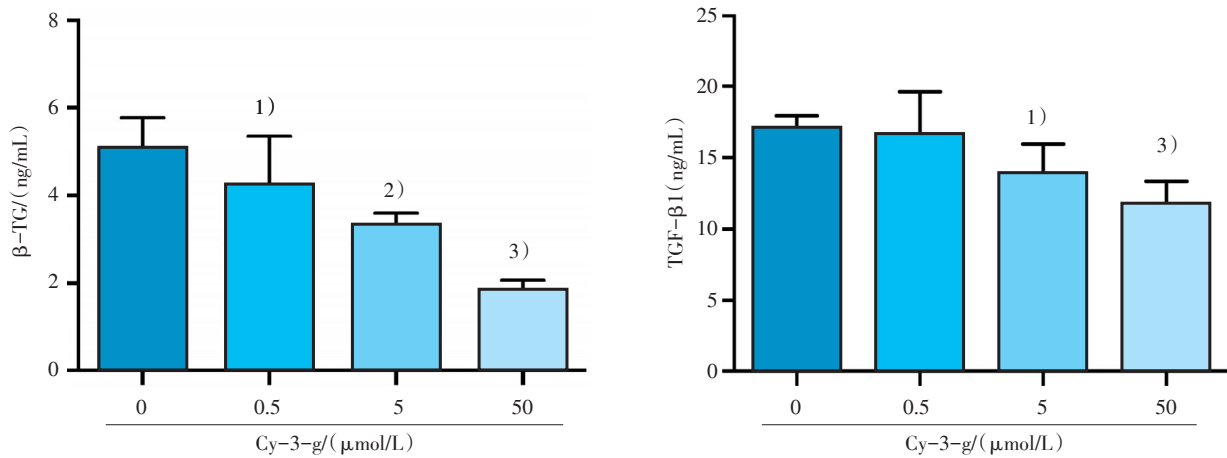
## 2 结果

### 2.1 花色苷体外抑制健康人纯化血小板分泌 $\beta$ -TG、TGF- $\beta$ 1

用不同浓度的花色苷与健康人纯化的血小板共同孵育60 min,检测血小板分泌的 $\beta$ -TG、TGF- $\beta$ 1的水平。结果显示,在与浓度为5  $\mu\text{mol/L}$ 和50  $\mu\text{mol/L}$ 的花色苷共孵育后,血小板分泌的 $\beta$ -TG、TGF- $\beta$ 1水平均被显著抑制,与对照组相比组间差异具有统计学意义( $P<0.05$ ;图1)。

### 2.2 花色苷体外抑制健康人纯化血小板分泌CCL5

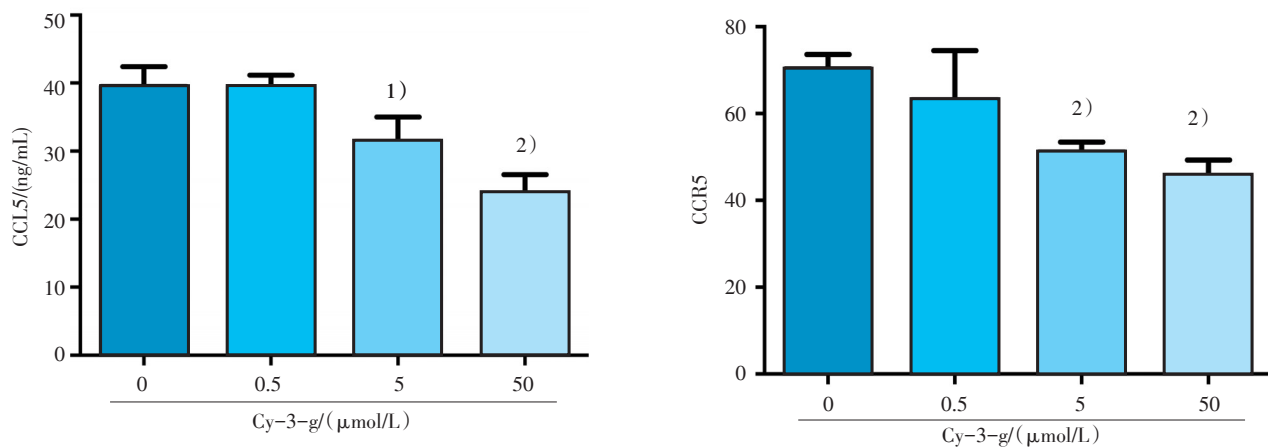
用不同浓度的花色苷在体外孵育健康人纯化的血小板,检测血小板分泌的CCL5的水平。结果显示,纯化血小板在被凝血酶激活后,可以分泌大量的CCL5;在终浓度为5  $\mu\text{mol/L}$ 和50  $\mu\text{mol/L}$ 花色苷组共孵育后,血小板分泌的CCL5水平均被显著抑制,与对照组相比组间差异具有统计学意义( $P<0.05$ ;图2)。



The Cy-3-g-treated groups showed a significant reduction of  $\beta\text{-TG}$ , TGF- $\beta$ 1 secretion by platelet compared to the control group.  $n=6/\text{group}$ ,  $\beta\text{-TG}$   $F=24.06$ ,  $P<0.001$ , TGF- $\beta$ 1  $F=8.75$ ,  $P<0.001$ , 1)  $P<0.05$  2)  $P<0.01$  and 3)  $P<0.001$  vs control group by Dunnett's  $t$ -test after ANOVA.

图1 花色苷抑制健康人纯化血小板 $\beta\text{-TG}$ , TGF- $\beta$ 1的释放

Fig.1 Cy-3-g significantly suppressed the level of  $\beta\text{-TG}$ , TGF- $\beta$ 1 secreted by platelets



The treatment of Cy-3-G (5 and 50  $\mu\text{mol/L}$  groups showed a significant reduction of CCL5 secretion by platelet compared to the control group.  $n=3/\text{group}$ ,  $F=21.3$   $P<0.001$ , 1)  $P<0.05$  and 2)  $P<0.01$  vs control group by Dunnett's  $t$ -test after ANOVA.

图2 花色苷抑制健康人纯化血小板CCL5的释放

Fig.2 Cy-3-g significantly suppressed the level of CCL5 secreted by platelets

The 5 and 50  $\mu\text{mol/L}$  groups showed a significant reduction of CCR5 expression on leukocyte compared to the control group.  $n=3/\text{group}$ ,  $F=9.57$   $P=0.01$ , 2)  $P<0.01$  vs control group by Dunnett's  $t$ -test after ANOVA.

图3 花色苷抑制健康人白细胞上CCR5的表达

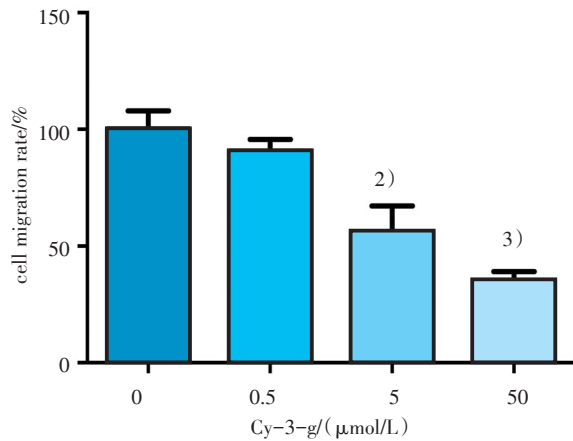
Fig.3 Cy-3-g inhibited the expression of CCR5 on leukocyte

### 2.3 花色苷体外抑制健康人白细胞表面CCR5的表达

用不同浓度的花色苷与健康人外周静脉血共同孵育60 min后,检测白细胞表面趋化因子受体CCR5的水平。结果显示,5  $\mu\text{mol/L}$ 和50  $\mu\text{mol/L}$ 的花色苷可以显著抑制白细胞表面CCR5的表达,与对照组相比,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ;图3)。

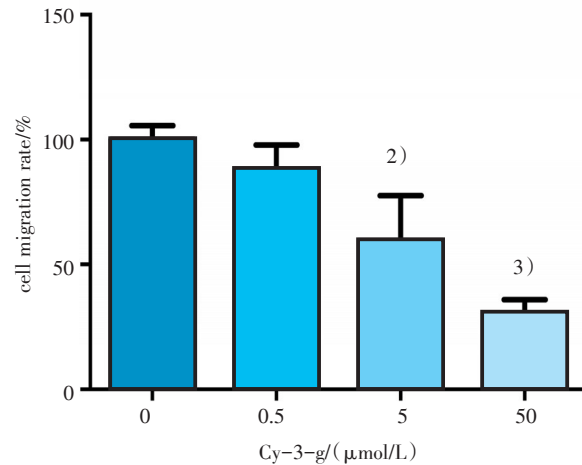
### 2.4 花色苷抑制血小板分泌物诱导的THP-1细胞迁移

健康人纯化血小板与不同浓度的花色苷孵育后收集上清液,将上清液与THP-1细胞共同孵育,检测THP-1细胞的迁移率。结果显示,与对照组相比,5  $\mu\text{mol/L}$ 和50  $\mu\text{mol/L}$ 的花色苷孵育后的血小板上清液所诱导的细胞迁移率明显降低,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ;图4)。



The 5 and 50  $\mu\text{mol/L}$  groups significantly decreased the THP-1 cells migration toward platelet secretory products.  $n=3/\text{group}$ ,  $F=47.77$   $P=0.00$ , 2)  $P<0.01$  and 3)  $P<0.001$  vs control group by Dunnett's  $t$ -test after ANOVA.

图4 花色苷抑制血小板分泌物诱导的THP-1细胞迁移  
Fig.4 Cy-3-g inhibited THP-1 cells migration toward platelet secretory products



The 5 and 50  $\mu\text{mol/L}$  groups significantly decreased the THP-1 cells migration toward platelet secretory products.  $n=3/\text{group}$ ,  $F=24.13$   $P<0.001$ , 2)  $P<0.01$  and 3)  $P<0.001$  vs control group by Dunnett's  $t$ -test after ANOVA.

图5 花色苷抑制CCL5诱导的THP-1细胞的迁移  
Fig.5 Cy-3-g inhibited THP-1 cells migration toward CCL5

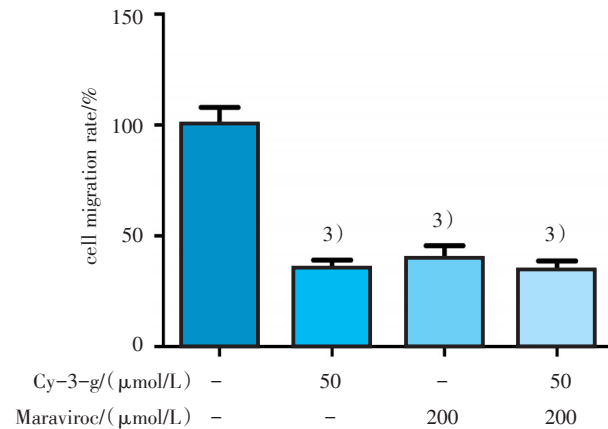
## 2.5 花色苷抑制CCL5诱导的THP-1细胞迁移

将THP-1细胞分别与不同浓度的花色苷孵育,再使用100 nmol/L的外源性CCL5作为趋化物诱导THP-1细胞的迁移。结果显示,与对照组相比,5  $\mu\text{mol/L}$ 和50  $\mu\text{mol/L}$ 的花色苷可显著抑制CCL5所诱导的THP-1细胞的迁移,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ;图5)。

为了进一步验证CCR5是否为花色苷抑制THP-1细胞迁移的靶点之一,我们加入了CCR5的特异性抑制剂Maraviroc。如图5所示,CCR5的抑制剂Maraviroc也显著抑制THP-1细胞的迁移( $P<0.05$ ),它与花色苷联合作用时,THP-1细胞的迁移率明显下降( $P<0.05$ ),然而与花色苷单独作用相比,差异没有统计学意义(图6)。

## 3 讨论

大量研究发现,花色苷及其提取物可以降低心血管疾病、糖尿病以及肿瘤等疾病的发病风险,主要归因于其抗炎,抗氧化,调节血脂以及改善内皮功能等作用<sup>[10-11]</sup>。我们课题组前期的研究发现花色苷单体可以显著抑制人和小鼠血小板的活化、聚集、血小板颗粒物的释放以及血栓的形成;在高胆固醇血症人群的干预实验中,我们发现花



200  $\mu\text{mol/L}$  Maraviroc significantly decreased the THP-1 cells migration toward CCL5, and the combination of 50  $\mu\text{mol/L}$  Cy-3-g and 200  $\mu\text{mol/L}$  Maraviroc could also decrease them.  $n=3/\text{group}$ ,  $F=92.34$   $P<0.001$ , 3)  $P<0.001$  vs control group by Dunnett's  $t$ -test after ANOVA.

图6 Maraviroc对花色苷抑制THP-1细胞迁移的影响  
Fig.6 Maraviroc significantly inhibited THP-1 cells migration toward CCL5

色苷可以显著降低高胆固醇血症患者血浆中LDL-C、IL-1 $\beta$ 等炎症因子,以及血小板趋化因子CXCL7、CCL5、CXCL5、CXCL8、CXCL12和CCL2的水平<sup>[12-13]</sup>,且发现血浆中CCL5水平的变化分别与炎症因子IL-1 $\beta$ 的变化成正相关关系<sup>[9]</sup>,说明

血小板趋化因子可能是花色苷发挥抗炎作用的靶点之一。

血小板在活化之后分泌大量的细胞因子、趋化因子以及各种趋化因子受体等,从而与白细胞、内皮细胞和血管平滑肌细胞等多种细胞相互作用,诱导白细胞活化、黏附、迁移以及血小板-白细胞聚合物的形成,促进炎症细胞招募至炎症病灶和功能紊乱的内皮细胞表面,参与血管炎症的病理过程<sup>[1-2]</sup>。血小板趋化因子与白细胞表面受体的结合,是连接血小板和白细胞的桥梁,在动脉粥样硬化的炎症细胞的迁移招募中起着关键的作用。而CCL5的受体CCR5主要表达于单核细胞和巨噬细胞的表面,在与血小板趋化因子CCL5特异性结合后,介导单核细胞的定向迁移以及黏附,并且可以促进巨噬细胞泡沫化,参与动脉粥样硬化的发生发展过程<sup>[14-15]</sup>。单核细胞在血小板趋化因子CCL5的趋化作用下,迁移至内皮炎症部位,分化成巨噬细胞,再而吞噬胆固醇形成泡沫细胞。因此动脉粥样硬化灶中的纤维脂质斑形成是通过单核细胞与巨噬细胞的招募和分化而实现的<sup>[16]</sup>。有研究显示,给Ldlr<sup>-/-</sup>小鼠进行Ccr5<sup>-/-</sup>的骨髓移植,发现动脉斑块中巨噬细胞的积聚减少,斑块稳定性增加,及病灶部位单核细胞的浸润减少,说明CCR5对单核细胞的迁移与黏附,以及巨噬泡沫细胞的形成相当重要<sup>[17]</sup>。通过抑制血小板趋化因子,或者单核细胞上的趋化因子受体,均有可能削弱血小板和单核细胞之间的这种趋化作用,从而减少单核细胞的招募,对免疫反应的产生和慢性炎症的发展起到关键作用。因此,我们首先选择CCL5及其受体CCR5进行进一步的探讨,研究花色苷是否可以通过抑制CCL5与CCR5相互作用,从而减弱单核细胞和血小板之间的相互作用,减轻慢性炎症的发展。

在本研究中我们首次验证了花色苷Cy-3-g在体外也可以抑制血小板生长因子TGF- $\beta$ 1、趋化因子 $\beta$ -TG、CCL5的分泌及白细胞的CCR5表达。而由于T细胞等也能分泌CCL5,因此我们在

体外将血小板从外周血中纯化分离,然后与花色苷进行孵育。结果证明纯化血小板可以分泌大量的CCL5,并且可以被花色苷显著抑制。在高胆固醇血症等刺激下,血小板被激活,迅速释放一系列趋化因子等促进炎症因子,将循环中的白细胞招募到损伤的内皮细胞表面促进炎症反应,并进一步促使血小板的自身活化,从而放大炎症效应促进动脉粥样硬化的发展。因此血小板来源的CCL5对动脉粥样硬化灶中的单核细胞的招募起关键的作用。为了证明花色苷也可以通过抑制CCR5而抑制对THP-1细胞的迁移,我们采用CCL5的重组蛋白分子对THP-1细胞进行诱导,结果发现,花色苷与THP-1细胞共孵育后,可以抑制由CCL5诱导的迁移作用,说明花色苷很可能通过抑制CCL5的受体CCR5而发挥抑制THP-1细胞迁移的作用。我们又进一步引入CCR5的抑制剂Maraviroc进行干预。结果表明Maraviroc也可以显著抑制THP-1细胞的迁移,但是花色苷与Maraviroc的联合作用的结果与花色苷单独作用的结果相比,差异没有统计学意义。因此我们推测花色苷极有可能是通过抑制CCR5的表达而抑制THP-1细胞的迁移,从而减弱对血小板和单核细胞之间的桥联作用,证明这可能是花色苷减轻炎症及抗动脉粥样硬化的发展的机制之一。

本研究也存在一定的不足之处:首先我们采用的人单核细胞株THP-1,未能在人或鼠静脉血中分离的单核细胞中验证;其次,白细胞上趋化因子受体的种类很多,本研究未能全面的研究花色苷对所有趋化因子受体的作用,以及未能比较花色苷对哪一个受体的作用最强;第三,受体下游的信号通路也很复杂,花色苷对白细胞迁移的具体作用机制仍未十分明确,可以在后续的研究中完善其机制探索。

综上所述,花色苷Cy-3-g在体外可以有效抑制CCL5/CCR5介导的THP-1细胞的迁移,从而为动脉粥样硬化的预防治疗提供了一定的理论依据。

#### 参考文献

[1] Assinger A, Koller F, Schmid W, et al. Hypochlorite-oxidized LDL induces intraplatelet ROS forma-

tion and surface exposure of CD40L-- A prominent role of CD36 [J]. *Atherosclerosis*, 2010, 213(1): 129-134.

[2] Ghasemzadeh M, Hosseini E. Platelet-leukocyte

- crosstalk: Linking proinflammatory responses to procoagulant state [J]. *Thromb Res*, 2013, 131(3): 191-197.
- [3] Li X, Zhu M, Penfold ME, et al. Activation of CXCR7 limits atherosclerosis and improves hyperlipidemia by increasing cholesterol uptake in adipose tissue [J]. *Circulation*, 2014, 129(11): 1244-1253.
- [4] Reichel CA, Pühr-Westerheide D, Zuchtriegel G, et al. C-C motif chemokine CCL3 and canonical neutrophil attractants promote neutrophil extravasation through common and distinct mechanisms [J]. *Blood*, 2012, 120(4): 880-890.
- [5] Wirtz TH, Tillmann S, Strussmann T, et al. Platelet-derived MIF: A novel platelet chemokine with distinct recruitment properties [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 239(1): 1-10.
- [6] Chuang J, Yang W, Chen H, et al. CCL5/CCR5 axis promotes the motility of human oral cancer cells [J]. *J Cellular Physiol*, 2009, 220(2): 418-426.
- [7] Thompson K, Pederick W, Santhakumar AB. Anthocyanins in obesity-associated thrombogenesis: A review of the potential mechanism of action [J]. *Food Fun*, 2016, 7(5): 2169-2178.
- [8] Luo T, Miranda-Garcia O, Adamson A, et al. Development of obesity is reduced in high-fat fed mice fed whole raspberries, raspberry juice concentrate, and a combination of the raspberry phytochemicals ellagic acid and raspberry ketone [J]. *J Berry Res*, 2016, 6(2): 213-223.
- [9] Zhang X, Zhu Y, Song F, et al. Effects of purified anthocyanin supplementation on platelet chemokines in hypocholesterolemic individuals: A randomized controlled trial [J]. *Nutr Metab*, 2016, 13: 86.
- [10] Edirisinghe I, Burton-Freeman B. Anti-diabetic actions of Berry polyphenols: Review on proposed mechanisms of action [J]. *J Berry Res*, 2016, 6(2): 237-250.
- [11] Alvarez-Suarez JM, Giampieri F, Tulipani S, et al. One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans [J]. *J Nutr Biochem*, 2014, 25(3): 289-294.
- [12] Li C, Li J, Li Y, et al. Crosstalk between platelets and the immune system: Old systems with new discoveries [J]. *Adv Hematol*, 2012, 2012: 384685.
- [13] Blair P, Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: Basic biology and clinical correlates [J]. *Blood Rev*, 2009, 23(4): 177-189.
- [14] Habets KLL, Huizinga TWJ, Toes REM. Platelets and autoimmunity [J]. *Eur J Clin Investig*, 2013, 43(7): 746-757.
- [15] Chuang J, Yang W, Chen H, et al. CCL5/CCR5 axis promotes the motility of human oral cancer cells [J]. *J Cellular Physiol*, 2009, 220(2): 418-426.
- [16] Moser B, Wolf M, Walz A, et al. Chemokines: Multiple levels of leukocyte migration control [J]. *Trends Immunol*, 2004, 25(2): 75-84.
- [17] Servant G, Weiner OD, Herzmark P, et al. Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis [J]. *Science*, 2000, 287(5455): 1037-1040.

(编辑 刘清海)