

[文章编号] 1007-3949(2004)12-06-0673-04

• 实验研究 •

福辛普利、卡托普利和缬沙坦对人血单核细胞中核因子 κ B 的影响

周 华¹, 张代富¹, 单 江²

(1. 同济大学附属东方医院心脏中心, 上海市 200120; 2. 浙江大学附属第二医院心内科, 浙江省杭州市 310009)

[关键词] 药理学; 血管紧张素转换酶抑制剂对单核细胞的作用; 蛋白印迹杂交; 福辛普利; 卡托普利; 缬沙坦; 核因子 κ B; 脂多糖

[摘要] 为探讨福辛普利、卡托普利和缬沙坦对人血单核细胞受细菌脂多糖刺激时核转录因子 κ Rel/p65 活化的影响。从健康产妇脐带血分离出单核细胞, 与脂多糖及脂多糖加不同药物培养, 按不同时间点收集细胞, 抽提蛋白。用 Western Blotting 技术检测 p50 和 p65 在胞质和胞核中的变化。结果发现, 福辛普利、卡托普利和缬沙坦可减弱 I κ B α 的降解, 抑制 p65 由胞浆转至核内。结果提示, 部分血管紧张素转化酶抑制剂及血管紧张素受体拮抗剂对在受脂多糖刺激时人血单核细胞转录因子的活化可产生抑制作用。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

The Effect of Fosinopril, Captopril and Valsartan on the Transcription Factor NF- κ B Activation in Monocytes

ZHOU Hua¹, ZHANG Dai Fu¹, and SHAN Jiang²

(1. Heart Center of East Hospital, Tongji University, Shanghai 200120; 2. Department of Cardiology, the 2nd Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China)

[KEY WORDS] Angiotensin; Monocytes; Transcription factors; Lipopolysaccharide; Antagonists; Nuclear Extract

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of ACEI and ARB on the transcription factor NF- κ B activation in monocytes induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Monocytes from normal delivered female umbilical veins were incubated with bacterial LPS in presence or absence of different ACE inhibitors or angiotensin ET_1 antagonists. At the end of incubation, the cells were harvested by trypsin digestion method. In order to evaluate a possible contribution of ACEI and ARB on NF- κ B activation induced by LPS, we used western blotting to study phosphorylation and degradation of inhibitor protein I κ B α in the cytoplasmic, the translocation of p65 subunits to the nucleus at different times. **Results** The data showed that LPS-dependent phosphorylation and degradation of I κ B α was markedly impaired in ACEI and ARB-treated monocytes and the translocation of p65 subunit to the nucleus was inhibited at the same time. **Conclusions** ACEI and ARB has inhibitory effect on the transcription NF- κ B activation in monocytes.

核因子 κ B 的不适当调节与许多病理状态相关, 因而是当前药物研究和疾病治疗的一个新靶点。 κ Rel/p65 是一异二聚体, 属于核因子 κ B 家族, 在胞浆中与核因子 κ B 抑制蛋白 α (inhibitor of nuclear factor κ B α , I κ B α) 结合在一起, 处于无活性状态。受刺激后 I κ B α 磷酸化而降解, p65 由胞浆转入核内启动 mRNA 的转录。本研究试图通过观察 I κ B α 的降解及 p50 和 p65 在胞质和胞核中的变化来研究血管紧张素转化酶抑制剂 (angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI) 中的福辛普利 (Fosinopril, Fosi)、卡托普利

(Captopril, Cap) 及血管紧张素 ET_1 型受体拮抗剂缬沙坦 (Valsartan, valsa) 对单核细胞由脂多糖诱导的转录因子 κ Rel/p65 活性的影响。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

美国 BIO-RAD 公司凝胶成像仪及图像分析系统、Bio-rad 微型转移电泳装置、硝酸纤维素膜、细胞裂解缓冲液、10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶分离胶 (8 mL)、5% Tris-甘氨酸-SDS 聚丙烯酰胺积层胶 (5 mL)、转移缓冲液、TBST 缓冲液、封闭液、抗人 I κ B α 、P65 多克隆抗体辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 HRP 第二抗体和 ECL 显色试剂盒。

1.2 细胞分离和培养

参照文献[1], 取 50 mL 用含 0.15 mol/L NaCl 浓

[收稿日期] 2004-03-25 [修回日期] 2004-08-20

[作者简介] 周华, 医学博士, 主要研究方向为动脉粥样硬化与冠心病及心肌细胞保护, E-mail 为 zhjzj0560@sohu.com。张代富, 医学硕士, 教授, 硕士研究生导师, 从事冠心病基础与临床研究。单江, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为心血管临床药理及心脏电生理与起搏。

度为 3.8% 枸橼酸钠抗凝的脐血, 180 g 10℃离心 15 min, 取中间白细胞沉淀层, 用含 0.15 mol/L NaCl 的 0.38% 枸橼酸钠稀释至原体积, 再次离心, 重复上述操作以去除血小板。将细胞悬液轻铺在淋巴细胞分离液上, 以 700 × g 20℃离心 20 min, 可见淋巴细胞分离液与稀释血浆之间有一细胞层, 用长吸管吸取此层细胞用含 0.15 mol/L NaCl 的 0.38% 枸橼酸钠在 620 × g 8℃下清洗并离心 2 次, 用无血清 RP-MI1640 培养基将细胞悬起, 所得为单个核细胞, 单核细胞约占 25% ~ 30%, 经 0.2% 台盼蓝拒染法染色, 细胞活性 > 90%, 计数细胞。用无血清 RP-MI1640 在六孔培养板将单个核细胞配成 3×10^{10} /L 的细胞悬液, 在 5% CO₂、37℃条件下培养 1 h, 吸去非贴壁的淋巴细胞, 用预热的培养基清洗至少五次, 纯化的单核细胞约占细胞总数的 85% ~ 90%。实验分为脂多糖(0.1 mg/L)刺激及脂多糖(0.1 mg/L)刺激加缬沙坦、Fosi 和 Cap(均 20 mg/L)干预组。脂多糖刺激组细胞培养时间分为 0、15、30 和 60 min, 干预组先用药物预处理 30 min 再加脂多糖, 然后接着培养 0、15、30 和 60 min。培养结束后用胰酶消化收集细胞。

1.3 蛋白和核蛋白的提取

按 Singh 等^[2]的方法, 至少 6×10^6 单核细胞用冷 PBS 清洗, 用 5 倍于细胞压积的低渗裂解液(10 mmol/L HEPES, pH 8.0; 10 mmol/L KCl; 0.1 mmol/L EDTA; 0.1 mmol/L EGTA; 1 mmol/L DTT; 0.5 mmol/L PMSF; 2.0 mg/L aprotinin), 冰浴 30 min, 加 10% NP40 10 μL, 振荡器上振荡 20 s, 4 000 r/min 离心 30 s, 收集上清 4℃、12 kr/min 重离心 2 min, 上清液为胞浆蛋白溶液。沉淀用 50 μL 冰高渗核裂解液(20 mmol/L HEPES, pH 8.0; 0.5 mol/L KCl; 1 mmol/L EDTA; 1 mmol/L EGTA; 1 mmol/L DTT; 1 mmol/L PMSF; 2.0 mg/L aprotinin, 20% 甘油)重悬, 冰浴 30 min, 以 4℃、12 kr/min 离心 10 min, 上清为核蛋白溶液。用 Bradford 法^[3]测定胞浆蛋白和核蛋白的浓度, 分装, 浸入液氮中速冻, -70℃保存。

1.4 蛋白印迹法(Western blotting)

取总蛋白 30 μg, 加入 4× 加样缓冲液, 沸水煮 3 min 使蛋白完全变性。再于 Tris-甘氨酸电泳缓冲液中, 用 100~200 V 电泳使其分离, 待溴酚蓝到达分离胶底部时停止电泳, 从电泳装置上卸下玻璃板, 切胶, 并做上记号。用 Bio-rad 微型转移电泳装置, 在转膜缓冲液中 100 V 1 h 将蛋白从凝胶电转印至硝酸纤维素膜。将转印后的硝酸纤维素膜取出, 用含 5% 脱脂奶粉 Tris 缓冲液 37℃ 1 h, 封闭硝酸纤维素

膜免疫球蛋白结合位点, 然后将硝酸纤维滤膜置入 1:500 抗人 IkBα 或 P65 多克隆抗体, 温和振荡 30 min 后放入 4℃冰箱孵育过夜。回收一抗, TBST 洗 3 次, 每次 5~10 min, 与辣根过氧化物酶共价偶联二级免疫球蛋白共温育 1 h, TBST 洗涤, 洗涤后显色。ECL A 和 B 液等体积混合, 将膜在溶液中温浴 60 s, 沥干, 用保鲜膜包裹, 置暗盒中、压片曝光数 min, 在爱克发胶片自动冲印系统中显影、定影。

1.5 图像分析

采用 BIO-RAD 公司凝胶成像仪及图像分析系统, 将凝胶或 X 光片通过摄像机输入图像, 选择参数, 自动计算 IkBα 或 P65 蛋白带的灰度值。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差分析进行处理。

2 结果

2.1 单核细胞核因子 κB 抑制蛋白 α 的变化

单核细胞加缬沙坦、Fosi 和 Cap 培养时各组胞浆中 IkBα 含量见表 1(Table 1)。可见各组差异无统计学意义。说明单独用缬沙坦、Fosi 和 Cap 对胞浆中 IkBα 含量不产生影响。

表 1. 各组核因子 κB 抑制蛋白 α 含量的灰度值 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Densitometry scans of IkBα in each groups

分 组	n	灰度值
对照组	3	12.8 ± 2.8
缬沙坦	3	14.0 ± 2.8
福辛普利	3	12.9 ± 5.2
卡托普利	3	12.2 ± 3.9

2.2 各组核因子 κB 抑制蛋白 α 的动态变化

脂多糖、缬沙坦、Fosi 和 Cap 组不同时间点的 IkBα 的测定结果见图 1(Figure 1) 和表 2(Table 2)。可见脂多糖组刺激后 IkBα 明显出现降解, 15 min、30 min 和 60 min 均呈这种变化, 而分别加入缬沙坦、Fosi 和 Cap 后 IkBα 降解的趋势明显减轻, 与脂多糖组同时间点比较, 差异具有显著性意义 ($P < 0.01$), 缬沙坦、Fosi 和 Cap 组间比较无明显差异。

2.3 各组 0 min 胞浆内 P65 的变化

脂多糖、缬沙坦、Fosi 和 Cap 组 0 min 时胞浆内 P65 的测定结果见表 3(Table 3)。可见在实验开始时各组胞浆内 P65 的差异无统计学意义。

表 2. 各组不同时间点核因子 κB 抑制蛋白 α 的相对灰度值 ($\bar{x} \pm s$)Table 2. Relative densitometry scans of I κ B α at different times in each group

分 组	n	0 min	15 min	30 min	60 min
脂多糖	3	1	0.15 $\pm$ 0.02 ^b	0.29 $\pm$ 0.03 ^b	0.62 $\pm$ 0.02 ^a
缬沙坦	3	1	0.66 $\pm$ 0.04 ^{a,b}	0.77 $\pm$ 0.03 ^d	0.86 $\pm$ 0.01 ^c
福辛普利	3	1	0.76 $\pm$ 0.12 ^d	0.79 $\pm$ 0.10 ^d	0.86 $\pm$ 0.07 ^c
卡托普利	3	1	0.63 $\pm$ 0.06 ^{a,b}	0.70 $\pm$ 0.13 ^d	0.87 $\pm$ 0.01 ^c

a: $P < 0.05$, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, 与 0 min 比较; b: $P < 0.01$; 与脂多糖组比较。

表 3. 各组 0 时间点胞浆 P65 灰度值 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3. Densitometry scans of P65 in the cytoplasmic at 0 times in each group

分 组	n	灰度值
脂多糖	3	5.9 $\pm$ 2.9
缬沙坦	3	6.0 $\pm$ 1.4
福辛普利	3	5.9 $\pm$ 0.36
卡托普利	3	6.7 $\pm$ 1.7

2.4 各组胞浆与核内 P65 的动态改变

脂多糖、缬沙坦、Fosi 和 Cap 组胞质和胞核中

P65 的含量见图 2(Figure 2) 和表 4(Table 4)。可见脂多糖组胞质 P65 逐渐降低, 胞核中 P65 逐渐增加, 说明 P65 由胞质向胞核移位, 缬沙坦、Fosi 和 Cap 组胞质中 P65 逐渐降低, 胞核中 P65 逐渐增加的趋势明显减轻, 与脂多糖组同时时间点比较差异显著 ($P < 0.01$); 缬沙坦、Fosi 和 Cap 组对应时间点间无明显差异 ($P > 0.05$)

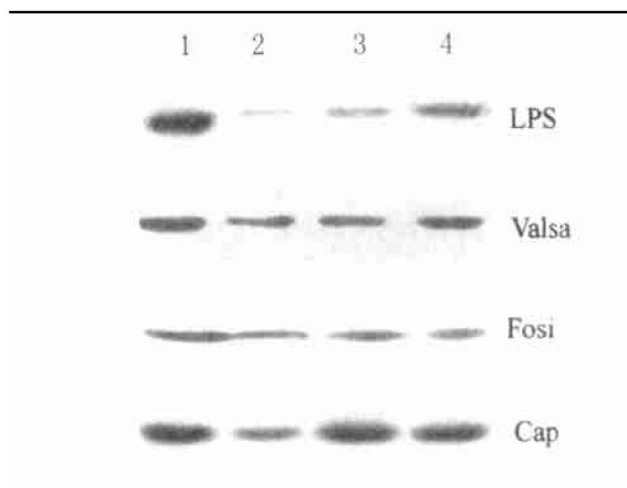


图 1. 福辛普利、卡托普利和缬沙坦对由脂多糖诱导的胞质中 I κ B α 降解的电泳结果 1 为 0 min, 2 为 15 min, 3 为 30 min, 4 为 60 min。

Figure 1. Effect of ACEI or ARB on LPS induced degradation of I κ B α in cytoplasm

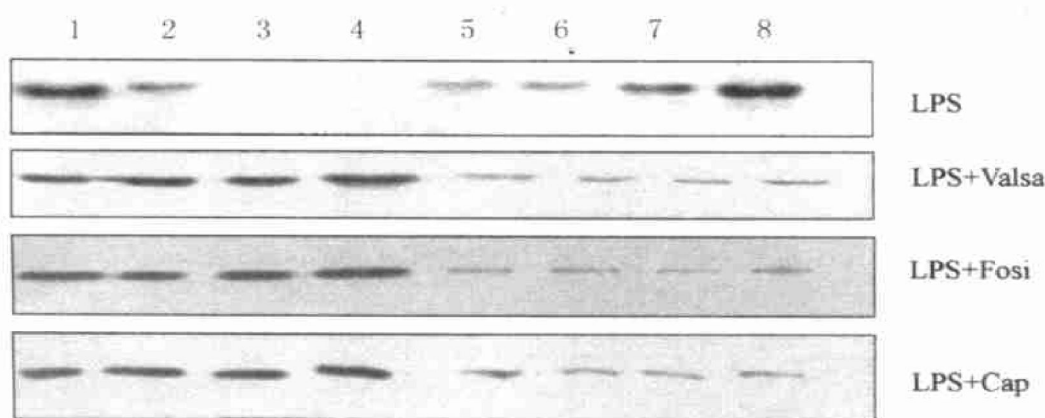


图 2. 福辛普利、卡托普利和缬沙坦对胞质及胞核中 P65 水平的影响 1~4 为胞质, 5~8 为胞核; 1 和 5 为 0 min, 2 和 6 为 15 min, 3 和 7 为 30 min, 4 和 8 为 60 min。

Figure 2. Effect of ACEI or ARB on level of in cytoplasm and nucleus

3 讨论

核因子 κB 是一种多效性基因调控蛋白, 有关核

因子 κB 的研究至今仍是热点之一, 在细胞增殖、细胞凋亡、胚胎发育、免疫功能等都涉及到核因

表 4. 各组不同时间点胞浆与细胞核 P65 的相对灰度值($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 4. Relative densitometry scans of P65 in the cytoplasmic and nuclear fractions at different times in each group

分 组	细胞质				细胞核			
	0 min	15 min	30 min	60 min	0 min	15 min	30 min	60 min
脂多糖	1	0.42±0.13	0.15±0.02 ^a	0.12±0.03 ^a	0.14±0.03	0.25±0.06	0.61±0.09 ^a	0.88±0.07 ^a
缬沙坦	1	0.93±0.01 ^b	0.9±0.01 ^b	0.87±0.03 ^b	0.14±0.03	0.19±0.07 ^b	0.20±0.07 ^b	0.21±0.08 ^b
福辛普利	1	0.92±0.03 ^b	0.9±0.04 ^b	0.89±0.04 ^b	0.15±0.01	0.17±0.02 ^b	0.19±0.03 ^b	0.21±0.02 ^b
卡托普利	1	0.92±0.05 ^b	0.9±0.04 ^b	0.9±0.05 ^b	0.15±0.02	0.17±0.02 ^b	0.19±0.03 ^b	0.21±0.04 ^b

a: $P < 0.01$, 与 0 min 比较; b: $P < 0.01$, 与脂多糖组比较。

子 κB 的作用^[1]。核因子 κB 在心血管疾病的发病机制中也起到起重要作用, 内皮细胞胞浆中核因子 κB 的活化和核转位是促进单核细胞的局部粘附以及迁移至动脉粥样硬化损伤好发部位的一个非常重要的前提条件, 与动脉粥样硬化损伤有关的许多重要基因的表达均受核因子 κB 的调控^[2,3]。 $\kappa Rel/p65$ 是核因子 κB 家族之一, 是由 κRel 和 P65 蛋白与 I κB 抑制因子构成的多聚体, 存在于细胞质中, 其中 κRel 和 P65 是异二聚体。 $\kappa Rel/p65$ 可受多种刺激物的刺激而活化, 尽管这些刺激物特异性结合的受体不同, 信号传导的途径不一, 但都要通过抑制因子 I $\kappa B\alpha$ 磷酸化降解这一共同途径, 随之 κRel 和 P65 蛋白进入细胞核, 高亲和力的结合一致寡核苷酸顺序 GGGpuNNpyCCC, 启动基因的转录^[4,6]。

已知炎症和细胞增殖的刺激在粥样硬化形成中起重要作用, 而这会使细胞内的核因子 κB 活化。斑块内包含有平滑肌细胞、内皮细胞、巨噬细胞, 这些病理细胞核内发现有 p65 蛋白^[7]。有人将 cis 片段转染进老鼠心肌, 干扰核因子 κB 的结合位点发现能降低心肌的缺血-再灌注损伤^[8]。在粥样硬化的进展期, 局部单核细胞趋化蛋白浓聚, 渗入的单核-巨噬细胞增多, 伴随核因子 κB 的活化, 而用 ACEI 类的 quinapril 后这种变化减轻^[9]。Schieffer 等曾证明缬沙坦对动脉粥样硬化旋切术切取的人冠状动脉斑块物质有抗炎作用^[10], 表明 ACEI 及 ARB 在粥样硬化的早期、进展期都有很好的作用。

本实验用 Western Blotting 技术发现, 未加脂多糖前单核细胞胞质中 P65 和 I $\kappa B\alpha$ 浓度较高, ACEI 和 ARB 对它们不产生影响。脂多糖组刺激后, 随着时间的推移, P65 和 I $\kappa B\alpha$ 的含量逐渐降低, 而细胞核内

的 P65 增加, 表明核因子 κB 活化。福辛普利、卡托普利和缬沙坦干预组胞质中 P65 和 I $\kappa B\alpha$ 的含量降低、胞核内 P65 增加较少, 说明福辛普利、卡托普利和缬沙坦可抑制核因子 κB 活化。本研究的结果提示 ACEI 及 ARB 在动脉粥样硬化预防及治疗的有益作用与它们能够抑制单核-巨噬细胞中的核因子 κB 活性有关。

[参考文献]

[1] Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell*, 1996, **87** (1): 13-20

[2] Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, et al. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein 1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule 1 on endothelial cells. *Circulation*, 1998, **98** (12): 1 164-171

[3] Edgington T. More cellular signals for atherogenesis? *Circulation*, 1998, **98** (12): 1 151-152

[4] Manna SK, Mukhopadhyay A, Van NT, Aggarwal BB. Silymarin suppresses TNF α -induced activation of NF-kappa B, κ -Jun N-terminal kinase, and apoptosis. *J Immunol*, 1999, **163** (12): 6 800-809

[5] 崔华, 何作云. 白藜三醇对黄嘌呤——黄嘌呤氧化酶致平滑肌细胞核因子 κB 活化及蛋白激酶 Ca 表达的干预. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (7): 617-621

[6] 欧和生, 廖端芳, 唐朝枢. 蛋白磷酸化对胞核因子 κB 活化的调节. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (1): 80-82

[7] Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, et al. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest*, 1996, **97** (7): 1 715-722

[8] Sawa Y, Morishita R, Suzuki K, Kagisaki K, Kaneda Y, Maeda K, et al. A novel strategy for myocardial protection using in vivo transfection of cis element 'decoy' against NF kappa B binding site: evidence for a role of NF kappa B in ischemic reperfusion injury. *Circulation*, 1997, **96** (9 SI): 280-284

[9] Hernandez-Presa M, Bustos C, Ortego M, Tunon J, Renedo G, Ruiz-Ortega M, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation, monocyte chemoattractant protein 1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation*, 1997, **95** (6): 1 532-541

[10] Schindler R, Dinarello CA, Koch K-M. Angiotensin-converting enzyme inhibitors suppress synthesis of tumour necrosis factor and interleukin 1 by human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine*, 1995, **7** (6): 526-533

(此文编辑 胡必利)