

氯沙坦通过下调单核细胞趋化蛋白 1 受体 表达抑制单核细胞活化

陈美芳¹, 谢秀梅¹, 杨天伦¹, 陈志雄¹, 李元建²

(中南大学 1. 湘雅医院心内科, 湖南省长沙市 410008; 2. 湘雅医学院心血管药理教研室, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 内科学; 单核细胞; 逆转录聚合酶链反应; 氯沙坦; 血管紧张素 Ⅱ; 单核细胞趋化蛋白 1, 受体

[摘要] 目的 探讨血管紧张素 Ⅱ对单核细胞趋化蛋白 1 受体 CCR2 表达的影响及氯沙坦的干预作用。方法 人单核细胞株与血管紧张素 Ⅱ(10^{-7} mol/L) 孵育, 加或不加氯沙坦 (10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} mol/L), 检测上清液中单核细胞趋化蛋白 1 水平、单核和内皮细胞粘附情况以及 CCR2 mRNA 的表达。结果 与对照组比较, 血管紧张素 Ⅱ明显增加单核细胞培养上清液中单核细胞趋化蛋白 1 水平 (26.46 ± 3.58 ng/L 比 10.56 ± 2.34 ng/L, $P < 0.01$), 增加单核内皮细胞间粘附 (596 ± 27 比 268 ± 16 , $P < 0.01$)。血管紧张素 Ⅱ刺激细胞后明显上调 CCR2 mRNA 表达, 氯沙坦能显著抑制血管紧张素 Ⅱ的作用, 降低单核细胞趋化蛋白 1 的水平, 减少单核内皮细胞间粘附, 下调 CCR2 mRNA 表达。结论 氯沙坦通过下调单核细胞趋化蛋白 1 受体 CCR2 基因表达抑制单核细胞活化。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Inhibitory Effect of Losartan on Monocytic Activation via Downregulation of Monocyte Chemoattractant Protein-1 Receptor Expression

CHEN Mei Fang, XIE Xiu-Mei, YANG Tian-Lun, CHEN Zhi-Xiong, and LI Yuan Jian

(1. Department of Cardiovascular Medicine, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008; 2. Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410078, China)

[KEY WORDS] Monocytes; Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction; Losartan; Angiotensin Ⅱ; Monocyte Chemoattractant Protein 1, Receptor

[ABSTRACT] Aim To investigate the effect of angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ) on the expression of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) receptor CCR2 and therapeutic effect of losartan on atherosclerosis. Methods Human monocytoid cell (THP-1) were treated with Ang Ⅱ (10^{-7} mol/L) for 24 h in the absence or presence of losartan (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} mol/L).

The level of MCP-1 in the medium, the adhesion of monocytes to endothelial cell and the expression of CCR2 mRNA were determined.

Results Compared with control, incubation of THP-1 with Ang Ⅱ (10^{-7} mol/L) for 24 h significantly elevated the concentrations of MCP-1 (26.46 ± 3.58 ng/L vs. 10.56 ± 2.34 ng/L, $P < 0.01$), increased the number of monocytes binding to endothelial cell (596 ± 27 vs. 268 ± 16 , $P < 0.01$) and upregulated the expression of CCR2 mRNA. Treatment with losartan decreased the levels of MCP-1, inhibited monocytic binding to endothelial cell, and downregulated the expression of CCR2 mRNA by Ang Ⅱ.

Conclusions These data suggest that treatment with losartan in vitro inhibits monocytic activation via downregulation of MCP-1 receptor CCR2 genetic expression.

研究证实急性冠状动脉综合征患者单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 水平与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 传统的危险因素以及死亡率、心肌梗死发生率呈正相关^[1]。血管紧张素 Ⅱ (angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ) 也是一种重要的致炎因子, 可诱导 MCP-1 等多种炎症因子释放增加^[2,3]。氯沙坦是血管紧张素 Ⅱ受体 (angiotensin Ⅱ receptor, AT1) 拮抗剂, 可延缓高血压患者 As 的发

生, 减少心血管事件的发生率和死亡率, 逆转靶器官损伤^[4,5]。本实验观察氯沙坦对单核内皮细胞粘附反应的影响, 并探讨其作用是否涉及 MCP-1 受体途径。

1 材料与方法

1.1 主要药品和试剂

人单核细胞株 (human monocytoid cell, THP-1, ATCC) 购自湘雅医学院细胞培养中心, 人脐静脉内皮细胞株 (human umbilical vein endothelial cell, hU-VEG-12, ATCC, CRL-2480) 购自北京协和医科大学肿瘤研究所。Ang Ⅱ和胰酶购自 Sigma 公司; 氯沙坦由

[收稿日期] 2006-08-11 [修回日期] 2006-12-20

[作者简介] 陈美芳, 博士, 主要从事心血管疾病防治, E-mail 为 meifang121@sohu.com。谢秀梅, 教授, 博士研究生导师, 主要从事老年心血管疾病的治疗, E-mail 为 xyxiexm@sina.com。通讯作者李元建, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管药理研究, E-mail 为 yuanjianli@yahoo.com。

美国默沙东公司馈赠; RPMI 1640 培养基系 Gibco 产品; 小牛血清购自杭州四季青公司; MCP-1 试剂盒购自上海森雄生物有限公司; TRIzol 购自 Promega; RT 试剂盒购自 Fermentas; 引物由上海生工技术有限公司合成。

1.2 单核细胞的培养和分组

取 THP-1 细胞株, 解冻复苏后加入含 15% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基制成细胞悬液, 接种于培养瓶中置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。1% 小牛血清处理 24 h 后将细胞密度调整为 1×10^9 个/L 接种于 6 孔培养板中, 加入不同处理因素。空白对照组用含 1% 小牛血清的培养基继续孵育 24 h; Ang Ⅱ处理组用含 10^{-7} mol/L Ang Ⅱ的培养基孵育细胞 24 h; 氯沙坦(L)组、氯沙坦(M)组和氯沙坦(H)组分别用 10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} mol/L 氯沙坦孵育 1 h 后加入 10^{-7} mol/L Ang Ⅱ继续培养 24 h。

1.3 酶联免疫吸附法

严格按照试剂盒要求, 采用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定 MCP-1。在含有抗 MCP-1 抗体包被的 96 孔板, 分别加入 MCP-1 标准品和样品各 100 μL, 37℃ 孵育 2 h, 洗板 5 次, 每孔加入 100 μL 酶标二抗, 37℃ 温育 1 h, 洗板 5 次, 加入底物 100 μL, 37℃ 闭光孵育 15 min, 每孔加入终止液 1 滴, 用酶标仪在 490 nm 处测定吸光值, 根据 MCP-1 标准曲线得到样本 MCP-1 的浓度。每组有 6 个样本, 每个样本均设置复孔。

1.4 细胞粘附实验

取 HUVEC-12 细胞株, 解冻复苏后加入含 10% 小牛血清、100 ku/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养基制成细胞悬液, 将细胞密度为 1×10^8 个/L 的细胞接种于 6 孔板。待细胞汇合后进行细胞粘附实验。粘附前 30 min, 用 Hanks 平衡液分别冲洗内皮细胞和单核细胞 2 次, 将 THP-1 细胞稀释到终浓度 10^9 个/L, 加入不同处理因素作用 24 h 后加入内皮细胞中 (每孔 1 mL), 37℃ 继续孵育 30 min, 用 Hanks 平衡液小心冲洗掉未粘附的单核细胞。然后在高倍显微镜下每孔随机选择 6 个视野 (hpf), 计数粘附的单核细胞数目。

1.5 逆转录聚合酶链反应

采用逆转录聚合酶链反应检测单核细胞趋化蛋白 1 受体 mRNA 表达。Trizol 法提取总 RNA, 取 2 μg 总 RNA 进行逆转录后取 2 μL 行聚合酶链反应。CCR2 上游引物 5'-ATG CTG TCC ACA TCT CGT TCT CG-3', 下游引物 5'-TTA TAA ACC AGC CGA GAC TTC CTG C-3', 扩增片段长度为 1 083 bp。PCR 反应

体系 20 μL, 反应条件为 94℃ 变性 45 s → 62℃ 退火 45 s → 72℃ 延伸 60 s, 40 个循环。β-actin 上游引物 5'-CTG TCC CTG TAT GCC TCT G-3', 下游引物 5'-ATG TCA CGC ACG ATT TCC-3', 扩增片段长度为 218 bp。PCR 反应体系 20 μL, 反应条件为 94℃ 变性 45 s → 58℃ 退火 45 s → 72℃ 延伸 60 s, 28 个循环。得到的 PCR 产物 2% 琼脂糖电泳并用成像系统扫描摄片。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 ANOVA 进行统计学处理, 组间差异采用 Newman-Keuls-Student 多重比较 *t* 检验, 双侧 *P* < 0.05 认为有统计学差异。

2 结果

2.1 氯沙坦对血管紧张素 Ⅱ诱导的单核细胞趋化蛋白 1 水平和单核内皮细胞粘附的影响

血管紧张素 Ⅱ(10^{-7} mol/L) 孵育单核细胞 24 h 后显著升高培养上清液中 MCP-1 水平, 增加单核内皮细胞间粘附, 氯沙坦 (10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} mol/L) 均能显著抑制该效应 (表 1)。

表 1. 氯沙坦对血管紧张素 Ⅱ诱导的单核细胞趋化蛋白 1 水平和单核内皮细胞粘附的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 6)

分 组	MCP-1 (ng/L)	细胞数/高倍镜
对照组	10.56 ± 2.34	268 ± 16
Ang Ⅱ处理组	26.46 ± 3.58 ^a	596 ± 27 ^a
氯沙坦(L)组	14.26 ± 2.96 ^b	371 ± 20 ^b
氯沙坦(M)组	13.95 ± 2.45 ^b	354 ± 20 ^b
氯沙坦(H)组	12.11 ± 2.12 ^b	322 ± 21 ^b

a 为 *P* < 0.01, 与对照组比较; b 为 *P* < 0.01, 与 Ang Ⅱ处理组比较。

2.2 氯沙坦对血管紧张素 Ⅱ诱导的 CCR2 mRNA 表达的影响

正常情况下, 单核细胞低水平表达 CCR2, 但表达很弱, 而给予 Ang Ⅱ(10^{-7} mol/L) 刺激 24 h 后, THP-1 细胞 CCR2 mRNA 表达明显上调, 氯沙坦 (10^{-7} 、 10^{-6} 和 10^{-5} mol/L) 均能抑制该效应 (图 1)。

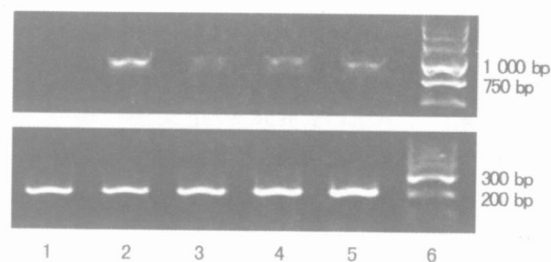


图 1. 氯沙坦对血管紧张素 Ⅱ诱导的 CCR2 mRNA 表达的影响 1 为对照组, 2 为 Ang Ⅱ处理组, 3 为氯沙坦(H)组, 4 为氯沙坦(M)组, 5 为氯沙坦(L)组, 6 为 Marker。

3 讨论

单核细胞趋化蛋白 1 是由机体多种细胞(主要是单核、巨噬细胞和内皮细胞)合成并分泌到外周血液的一类趋化蛋白,属于趋化因子 CC 亚家族,在体内及体外均有强大的诱导单核、巨噬细胞聚集、附壁、游走的功能,是炎症的始动因子及标志。研究显示 As 组织中单核源性泡沫细胞可产生大量 MCP-1,进一步促进单核细胞聚集于斑块中,使得斑块不稳定,容易破裂;有研究证明 As 病灶内 MCP-1 及其受体 mRNA 表达呈阳性,MCP-1 水平增高是预测心脏猝死和心肌梗死的独立危险因素^[1]。MCP-1 的特异受体 CCR2 表达于单核细胞、记忆 T 细胞和嗜碱粒细胞,在 CCR2 基因敲除小鼠,Ang Ⅱ诱导的单核巨噬细胞浸润和聚集几乎完全阻断^[6]。研究证明经 MCP-1 处理的单核细胞,细胞内 CCR2 mRNA 的量及细胞表面 CCR2 的表达虽然没有升高,但其与 MCP-1 的亲合力却提高 6 倍^[7]。在体研究表明,高血压患者和动物模型的循环中单核细胞的 CCR2 mRNA 表达增加,AT1 受体敲除后 CCR2 mRNA 表达下降^[8]。这些说明 MCP-1 通过其受体 CCR2 募集单核细胞聚集粘附于受损内皮,因此在 As 病理生理过程中发挥着至关重要的作用。

肾素-血管紧张素-醛固酮系统的激活同样参与 As 的发生发展。Ang Ⅱ作为一种强烈的致炎因子,它可诱导内皮细胞凋亡,成纤维细胞和单核细胞增殖、游走,并促使单核细胞向巨噬细胞转化,刺激多种生长因子、细胞因子、趋化因子的产生诱导强大的血管炎症反应^[2,9,10]。体外实验表明,氧化型低密度脂蛋白和肿瘤坏死因子能刺激单核细胞产生 MCP-1^[11,12]。然而有关 Ang Ⅱ是否对 MCP-1 受体表达有直接影响未见报道。单核巨噬细胞是重要的免疫细胞,也是粥样硬化斑块的主要构成成分,单核细胞不仅可以作为炎症细胞因子的效应细胞,也可自行合成和分泌多种炎症因子而影响其他细胞功能。

本研究选用人单核细胞系细胞为研究对象,给予 Ang Ⅱ刺激,结果发现 Ang Ⅱ诱导 THP-1 细胞产生 MCP-1 增加,促进单核粘附到内皮细胞,并且上调单核细胞 CCR2 mRNA 表达,表明 Ang Ⅱ可以通过激活 MCP-1 和上调 CCR2 表达诱发炎症反应参与 As 的病理过程。

氯沙坦是一种非肽类 AT1 受体拮抗剂,竞争性地与内皮细胞、单核细胞以及平滑肌细胞上的 AT1 受体结合,从而拮抗 Ang Ⅱ的生物学效应。研究表明,氯沙坦可拮抗 Ang Ⅱ所致的平滑肌细胞内 MCP-

1 的表达与分泌,其它血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)也可抑制 Ang Ⅱ诱导的核转录因子的激活从而抑制白细胞介素 8(interleukin-8, IL-8)和 MCP-1 等致炎因子的释放^[3,13]。临床研究证实,应用血管紧张素转换酶抑制剂或 AT1 受体拮抗剂能使高血压、冠心病患者和急性心肌梗死患者死亡率、心血管事件的发生率明显降低。本研究也显示氯沙坦可逆转 Ang Ⅱ诱导的 THP-1 细胞 MCP-1 水平的增高,下调 CCR2 mRNA 表达,抑制单核细胞活化,这可能与抗 As 作用密切相关。

[参考文献]

- [1] de Lemos JA, Morrow DA, Sabatine MS, Murphy SA, Gibson CM, Antman EM, et al. Association Between plasma levels of monocyte chemoattractant protein 1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes [J]. *Circulation*, 2003, **107** (5): 690-695.
- [2] Schmeisser A, Soehnlein O, Illmer T, Lorenz HM, Eskafi S, Roerick O, et al. ACE inhibition lowers angiotensin II-induced chemokine expression by reduction of NF- κ B activity and AT1 receptor expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **325** (2): 532-540.
- [3] 李爱民,何作云,周小波,覃军,耿建萌. 氯沙坦对血管平滑肌细胞内单核细胞趋化因子 1 表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (2): 108-111.
- [4] Wachtell K, Horneham B, Lehto M, Slotwiler DJ, Gerdtis E, Olsen MH, et al. Cardiovascular morbidity and mortality in hypertensive patients with a history of atrial fibrillation: The Losartan Intervention For End Point Reduction in Hypertension (LIFE) study [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, **45** (5): 705-711.
- [5] Kowey PR, Dickson TZ, Zhang Z, Shahinfar S, Brenner BM. Losartan and endorgan protection—lessons from the RENAAL study [J]. *Clin Cardiol*, 2005, **28** (3): 136-142.
- [6] Ishibashi M, Hiasa K, Zhao Q, Inoue S, Ohtani K, Kitamoto S, et al. Critical role of monocyte chemoattractant protein 1 receptor CCR2 on monocytes in hypertension-induced vascular inflammation and remodeling [J]. *Circ Res*, 2004, **94** (9): 1 203-210.
- [7] Kito K, Morishita K, Nishida K. MCP-1 receptor binding affinity is up-regulated by pre-stimulation with MCP-1 in an actin polymerization-dependent manner [J]. *J Leukoc Biol*, 2001, **69** (4): 666-674.
- [8] Bush E, Maeda N, Kuziel WA, Dawson TC, Wilcox JN, DeLeon H, et al. CC chemokine receptor 2 is required for macrophage infiltration and vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension [J]. *Hypertension*, 2000, **36** (3): 360-363.
- [9] Brasier AR, Recinos III A, Elechris MS. Vascular inflammation and the renin-angiotensin system [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (8): 1 257-266.
- [10] Nabah YN, Mateo T, Estelles R, Mata M, Zagorski J, Sarau H, et al. Angiotensin II induces neutrophil accumulation in vivo through generation and release of CXC chemokines [J]. *Circulation*, 2004, **110** (23): 3 581-586.
- [11] Han KH, Chang MK, Boullier A, Green SR, Li A, Glass CK, et al. Oxidized LDL reduces monocyte CCR2 expression through pathways involving peroxyl-proliferator-activated receptor gamma [J]. *J Clin Invest*, 2000, **106** (6): 793-802.
- [12] Weber C, Draude G, Weber KS, Wubert J, Lorenz RL, Weber PC. Downregulation by tumor necrosis factor-alpha of monocyte CCR2 expression and monocyte chemotactic protein 1-induced transendothelial migration is antagonized by oxidized low-density lipoprotein: a potential mechanism of monocyte retention in atherosclerotic lesions [J]. *Atherosclerosis*, 1999, **145** (1): 115-123.
- [13] 周华,张代富,单江. 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[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (6): 673-676.

(此文编辑 朱雯霞)