

## • 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2007)15-02-0090-03

## 去甲肾上腺素对 THP-1 源性巨噬细胞 转化生长因子 $\beta 1$ 表达的影响

邹正生<sup>1</sup>, 张彩平<sup>2</sup>, 龙石银<sup>2</sup>, 田英<sup>2</sup>, 涂玉林<sup>1</sup>

(南华大学 1. 心血管病研究所, 2. 生物化学与分子生物学教研室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 去甲肾上腺素; THP-1 源性巨噬细胞; 转化生长因子  $\beta 1$ 

[摘要] 目的 探讨去甲肾上腺素对人 THP-1 源性巨噬细胞转化生长因子  $\beta 1$  表达的影响。方法 不同浓度的去甲肾上腺素 (10 pmol/L ~ 10  $\mu$ mol/L) 作用 THP-1 源性巨噬细胞 24 h, 运用逆转录多聚酶链反应检测转化生长因子  $\beta 1$  mRNA 的表达, 酶联免疫吸附试验检测转化生长因子  $\beta 1$  蛋白的表达。结果 100 nmol/L、1  $\mu$ mol/L 及 10  $\mu$ mol/L 去甲肾上腺素引起巨噬细胞中转化生长因子  $\beta 1$  mRNA 水平分别下降 9.3% ( $P < 0.05$ )、39.5% ( $P < 0.01$ ) 和 47.8% ( $P < 0.01$ ), 1  $\mu$ mol/L 及 10  $\mu$ mol/L 的去甲肾上腺素作用于 THP-1 巨噬细胞其细胞上清中转化生长因子  $\beta 1$  蛋白含量分别下降 24.7% ( $P < 0.01$ ) 和 32.8% ( $P < 0.01$ )。结论 应激浓度的去甲肾上腺素能降低 THP-1 源性巨噬细胞转化生长因子  $\beta 1$  基因的表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effects of Noradrenalin on Transforming Growth Factor $\beta 1$ Expressions in Human THP-1 Macrophage Cells

ZOU Zheng-Sheng<sup>1</sup>, ZHANG Cai-Pin<sup>2</sup>, LONG Shi-Yin<sup>2</sup>, TIAN Ying<sup>2</sup>, and TU Yu-Lin<sup>1</sup>

(1. Institute of Cardiovascular Disease, 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Noradrenalin; Human THP-1 macrophage cells; Transforming growth factor  $\beta 1$ 

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of noradrenalin on the expressions of transforming growth factor (TGF- $\beta 1$ ) in human THP-1 macrophage cells. **Methods** THP-1 macrophage cells were incubated with different concentrations of noradrenalin (10 pmol/L ~ 10  $\mu$ mol/L) for 24 hour. Then the mRNA levels of TGF- $\beta 1$  were determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Levels of TGF- $\beta 1$  in the supernatants of cells were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** THP-1 macrophage cells which treated with 100 nmol/L, 1  $\mu$ mol/L and 10  $\mu$ mol/L noradrenalin, the mRNA levels of TGF- $\beta 1$  decreased 9.3% ( $P < 0.05$ ), 39.5% ( $P < 0.01$ ) and 47.8% ( $P < 0.01$ ) respectively. THP-1 macrophage cells which treated with 1  $\mu$ mol/L and 10  $\mu$ mol/L noradrenalin, the protein levels of TGF- $\beta 1$  decreased 24.7% ( $P < 0.01$ ) and 32.8% ( $P < 0.01$ ) respectively. **Conclusion** Stress induced increase of noradrenalin concentrations cause TGF- $\beta 1$  expression decreased in human THP-1 macrophage cells.

许多证据表明心理社会应激参与一部分心血管疾病如动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的起病和进程<sup>[1]</sup>。应激状态下, 包括去甲肾上腺素在内的一系列化学介质的释放增加, 参与 As 发生发展的过程<sup>[2]</sup>。我们在实验中观察到应激浓度的去甲肾上腺素能显著减少载脂蛋白 AI 介导的 THP-1 巨噬细胞泡沫细胞内胆固醇的流出, 增加细胞对氧化型低密度脂蛋白的摄取, 促进受试细胞泡沫化的形成。转化生长因子(transforming growth factor  $\beta 1$ , TGF- $\beta 1$ )是与 As 形成相关的基因<sup>[3]</sup>, TGF- $\beta 1$  能抑制由内源性和氧化脂

蛋白诱导的巨噬细胞蓄积胆固醇, 从而抑制巨噬细胞泡沫化<sup>[3]</sup>。为观察应激浓度的去甲肾上腺素促进 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞的形成是否通过影响 TGF- $\beta 1$  基因的表达而起作用, 我们采用不同浓度的去甲肾上腺素作用 THP-1 源性巨噬细胞, 观测受试细胞 TGF- $\beta 1$  基因表达的变化, 以探讨心理社会应激在 As 形成中的作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 仪器和试剂

人单核细胞 THP-1 由中国科学院上海细胞库提供; 逆转录多聚酶链反应试剂盒为美国 Promega 公司产品; Trizol 为 Invitrogen 公司产品; 2 × Taq PCR MasterMix 为北京天为时代公司产品; TGF- $\beta 1$  ELISA kit 购自美国 TPI Inc 公司; TGF- $\beta 1$  和 GAPDH 引物均

[收稿日期] 2006-11-30 [修回日期] 2007-02-06

[基金项目] 湖南省自然科学基金(03JJY5016); 湖南省卫生厅课题(B2004-076); 湖南省教育厅课题(04C542)

[作者简介] 邹正生, 联系电话 0734-8281203。田英, 教授, 联系电话 0734-8282749。通讯作者涂玉林, 教授, 联系电话 0734-8281345

由上海生物工程公司合成;其他试剂均为进口或国产分析纯。

## 1.2 细胞培养分化与去甲肾上腺素处理

人单核细胞系 THP-1 细胞,使用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,每三天传代一次。于传代后第一天收集细胞,以  $4 \times 10^6$  个接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶,每瓶含 8 mL 培养基,再加入 8 μL 100 μmol/L 佛波酯(Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)使终浓度为 100 nmol/L, 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养三天,显微镜下观察发现此时细胞呈贴壁状态,形状不规则并有伪足伸出,证实 THP-1 细胞已分化为巨噬细胞,此时更换为含去甲肾上腺素的无血清培养基,使去甲肾上腺素终浓度依次为 0、10 pmol/L、100 pmol/L、1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L、1 μmol/L 和 10 μmol/L,在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中孵育 24 h。

## 1.3 转化生长因子 β1 mRNA 表达的逆转录聚合酶链反应检测

收集各组 THP-1 源性巨噬细胞。按 Trizol 试剂盒(Invitrogen 公司)说明书提取细胞总 RNA。采用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法检测 RNA 的纯度和浓度。取 2 μg 各组细胞总 RNA 逆转录合成 cDNA,再取 1 μL 逆转录产物进行 PCR 循环。94℃预变性 4 min 后,94℃变性 1 min → 60℃退火 30 s → 72℃延伸 1 min,28 个循环后 72℃延伸 10 min。人 GAPDH 的引物序列为上游 5'-TGT CGC TGT TGA AGT CAG AG-3';下游 5'-TCA CCA TCT TCC AGG AGC GAG-3',产物长度 696 bp;人 TGF-β1 的引物序列为上游 5'-GCC CTG GAC ACC AAC TAT TGC T-3',下游 5'-AGG CTC CAA ATG TAG GGG CAG G-3',产物长度 161 bp。取 PCR 产物 6 μL 上样于 2% 琼脂

糖凝胶,90 V 电压,电泳 1 h 后在紫外可见分析装置下拍照。图像采用凝胶成像分析系统获得 3 磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)和目的条带的平均灰度值,以目的条带与 GAPDH 的比值变化来衡量各基因表达的相对变化。

## 1.4 转化生长因子 β1 蛋白表达的酶联免疫吸附法检测

取 THP-1 源性巨噬细胞,10% 胎牛血清 DMEM 培养基调整细胞浓度,以  $0.5 \times 10^7$  个/L 接种于 96 孔平底培养板中,37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 3 天后,更换为无血清培养基,加入去甲肾上腺素,使其终浓度分别为 10 pmol/L、100 pmol/L、1 nmol/L、10 nmol/L、100 nmol/L、1 μmol/L 和 10 μmol/L,同时设对照组,每组 3 个复孔。处理 24 h 后,按 TGF-β1 ELISA kit(TPI Inc. USA 公司)操作步骤进行,实验重复三次。以 OD 值为纵坐标,以标准品为横坐标(半对数坐标),绘制标准曲线。根据血清样品的 OD 值可在标准曲线上查出其浓度。

## 1.5 统计学处理

所得数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,全部数据经方差齐性分析后,采用单因素方差分析或配对 *t* 检验进行显著性检验,  $P < 0.05$  判断数据有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 去甲肾上腺素对 TGF-β1 mRNA 表达的影响

THP-1 源性巨噬细胞 TGF-β1 mRNA 的表达结果见图 1 和表 1。100 nmol/L、1 μmol/L 及 10 μmol/L 的去甲肾上腺素作用于 THP-1 巨噬细胞其 TGF-β1 mRNA 水平分别下降 9.3% ( $P < 0.05$ ), 39.5% ( $P < 0.01$ ) 和 47.8% ( $P < 0.01$ )。

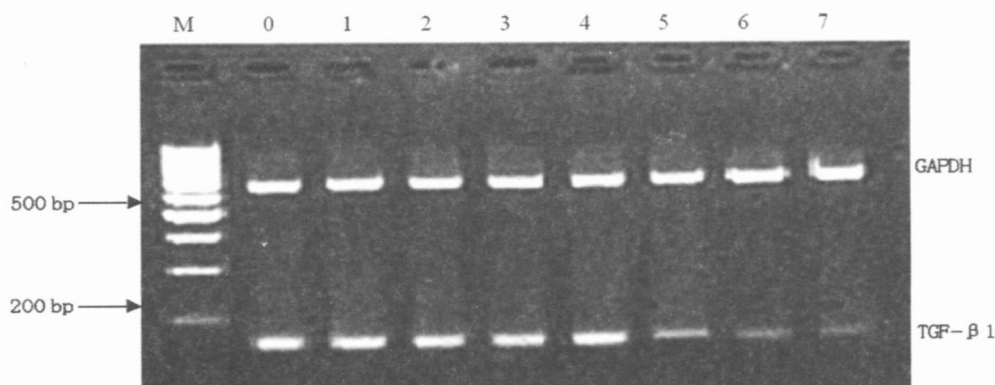


图 1. 不同浓度去甲肾上腺素对转化生长因子 β1 mRNA 表达的影响

M 为 Marker, 0 为对照, 1 为 10 pmol/L, 2 为 100 pmol/L, 3 为 1 nmol/L, 4 为 10 nmol/L, 5 为 100 nmol/L, 6 为 1 μmol/L, 7 为 10 μmol/L。

M 为 Marker, 0 为对照, 1 为 10 pmol/L, 2 为 100 pmol/L, 3 为 1

表 1. 不同浓度去甲肾上腺素对转化生长因子  $\beta 1$  mRNA 和蛋白表达的影响

去甲肾上腺素浓度	TGF- $\beta 1$ mRNA (n= 6)	TGF- $\beta 1$ 蛋白 (ng/L, n= 3)
0 (对照)	0.81 $\pm$ 0.05	267.6 $\pm$ 18.7
10 pmol/L	0.85 $\pm$ 0.07	274.3 $\pm$ 11.6
100 pmol/L	0.85 $\pm$ 0.07	269.9 $\pm$ 8.7
1 nmol/L	0.82 $\pm$ 0.10	261.6 $\pm$ 12.5
10 nmol/L	0.83 $\pm$ 0.05	258.1 $\pm$ 9.7
100 nmol/L	0.73 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	249.5 $\pm$ 26.4
1 $\mu$ mol/L	0.49 $\pm$ 0.06 <sup>c</sup>	201.6 $\pm$ 10.3 <sup>c</sup>
10 $\mu$ mol/L	0.42 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	179.7 $\pm$ 13.6 <sup>c</sup>

b 为  $P < 0.05$ , c 为  $P < 0.01$ , 与对照细胞比较。

## 2.2 去甲肾上腺素对细胞上清中转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白的影响

细胞上清中 TGF- $\beta 1$  蛋白的水平见表 1。结果发现, 1  $\mu$ mol/L 及 10  $\mu$ mol/L 的去甲肾上腺素作用于 THP-1 巨噬细胞其细胞上清中 TGF- $\beta 1$  含量分别下降 24.7% ( $P < 0.01$ ) 和 32.8% ( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

心理社会应激在现代社会人群中普遍存在, 流行病学调查研究表明, 相当多的 As 患者发病与心理社会因素密切相关<sup>[1]</sup>, 越来越多的研究结果支持 As 是血管壁持久而过度的炎症反应的结果<sup>[4]</sup>。反复的或者慢性应激与急性反应物质共同促进炎症反应, 激活巨噬细胞产生自由基, 修饰脂质, 转变为泡沫细胞和激活凝血途径形成稳定或者不稳定的斑块<sup>[4,6]</sup>。TGF- $\beta 1$  是一种与血管重建及动脉粥样硬化生成相关的多功能生长因子, 分泌可见于包括外周血单核细胞、内皮细胞和血管平滑肌细胞在内的多种细胞, 被认为是一种抗动脉粥样硬化的因子<sup>[7]</sup>。临床有报道动脉粥样硬化病人的血清 TGF- $\beta 1$  较正常水平低<sup>[8]</sup>, 实验证实动脉内膜的 TGF- $\beta 1$  能阻止高胆固醇喂养的小鼠内膜脂质沉着<sup>[9]</sup>。TGF- $\beta 1$  能抑制由内源性和氧化脂蛋白诱导的巨噬细胞蓄积胆固醇, 从而抑制巨噬细胞泡沫化<sup>[10]</sup>。但 TGF- $\beta 1$  抑制巨噬细胞泡沫化的作用机制尚未完全阐明。为了解心理社

会应激对 THP-1 巨噬细胞 TGF- $\beta 1$  表达的影响, 本实验采用不同浓度的去甲肾上腺素作用 THP-1 源性巨噬细胞, 观察到应激水平 (100 nmol/L~ 10  $\mu$ mol/L) 的去甲肾上腺素 (生理浓度的 10~ 1 000 倍) 作用 24 h 后, TGF- $\beta 1$  mRNA 水平分别下降 9.3%、39.5% 和 47.8%, 其蛋白水平的变化与 mRNA 水平的变化一致。表明应激水平的去甲肾上腺素能降低 TGF- $\beta 1$  的表达, 提示应激状态导致的去甲肾上腺素水平的升高可能通过下调 TGF- $\beta 1$  基因的表达, 从而减弱了其细胞氧化修饰 LDL 摄取的抑制作用, 进而加速巨噬细胞泡沫化的进程, 参与 As 的发生发展。

因此, 我们认为心理应激状态导致儿茶酚胺类激素去甲肾上腺素水平升高, 能抑制巨噬细胞 TGF- $\beta 1$  基因的表达, 从而加速动脉粥样硬化的进程, 这可能为进一步研究应激和心血管疾病之间的连接机制提供了新的思路。

## [参考文献]

- [1] Rozanski A, Blumenthal JA, Kaplan J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy [J]. *Circulation*, 1999, **99** (16): 2 192-217.
- [2] Peterson PK, Chan CC, Molitor M, Murtaugh M, Strgar F, Sharp BM. Stress and pathogenesis of infectious disease [J]. *Rev Infect Dis*, 1991, **13** (4): 710-720.
- [3] Grainger DJ. Transforming growth factor- $\beta$  and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (3): 399-404.
- [4] 王燕, 杨永宗. 炎症反应在动脉粥样硬化发病学中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (7): 706-708.
- [5] 张娜, 刘洪涛. 心理应激对脂质代谢影响的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (2): 191-192.
- [6] 田俊, 屈伸, 王燕, 李映红, 王宇哲, 宗义强. 极低密度脂蛋白受体在泡沫细胞形成中的作用地位[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (5): 502-506.
- [7] Erren M, Reinecke H, Junker R, Folker M, Schulte H, Schurek JO, et al. Systemic inflammatory parameters in patients with atherosclerosis of the coronary and peripheral arteries [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19** (10): 2 355-363.
- [8] Wang XL, Liu SX, Wilcken DE. Circulating transforming growth factor  $\beta 1$  and coronary artery disease [J]. *Cardiovasc Res*, 1997, **34** (2): 404-410.
- [9] Bobik A, Agrotis A, Kanellakis P, Dille R, Krushinsky A, Smirnov V, et al. Distinct patterns of transforming growth factor- $\beta$  isoform and receptor expression in human atherosclerotic lesions. Colocalization implicates TGF- $\beta$  in fibrofatty lesion development [J]. *Circulation*, 1999, **99** (22): 2 883-891.
- [10] Baccante G, Mincione G, Di Marcantonio MC, Picciorelli A, Cuccurullo F, Porreca E, et al. Pravastatin upregulates transforming growth factor- $\beta 1$  in THP-1 human macrophages: effect on scavenger receptor class A expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **314** (3): 704-710.

(此文编辑 胡必利)