

[文章编号] 1007-3949(2007)15-03-04

·实验研究·

血管紧张素  $\text{Ang II}$  对巨噬细胞表达肿瘤坏死因子转化酶的影响吴超能<sup>1</sup>, 蒲晓群<sup>2</sup>, 方崇峰<sup>1</sup>, 江建军<sup>1</sup>, 唐礼江<sup>1</sup>

(1. 温州医学院附属台州医院, 浙江省台州市 317000; 2. 中南大学湘雅医院心内科, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 病理与病理生理学; 动脉粥样硬化; 炎症; 血管紧张素  $\text{Ang II}$ ; 佛波酯; 巨噬细胞; 肿瘤坏死因子转化酶; 逆转录-聚合酶链反应

[摘要] 目的 研究血管紧张素  $\text{Ang II}$  对经佛波酯分化的人急性白血病单核细胞表达肿瘤坏死因子转化酶 mRNA 的影响, 探讨两者之间的联系, 以进一步了解它们在动脉粥样硬化中的地位。方法 将不同浓度血管紧张素  $\text{Ang II}$  ( $10^{-10} \sim 10^{-7}$  mol/L) 与经佛波酯 (40 nmol/L) 分化后的人急性白血病单核细胞共孵育 24 h, 以及将血管紧张素  $\text{Ang II}$  ( $10^{-7}$  mol/L) 与细胞作用不同时间 (0、6、12、24 和 48 h), 采用半定量逆转录-聚合酶链反应法检测肿瘤坏死因子转化酶 mRNA 表达的情况。结果 经佛波酯诱导后, 人急性白血病单核细胞分化为巨噬细胞并表达肿瘤坏死因子转化酶 mRNA。不同浓度的血管紧张素  $\text{Ang II}$  作用于细胞 24 h, 肿瘤坏死因子转化酶 mRNA 的表达呈浓度依赖性增加, 差异具有显著性。血管紧张素  $\text{Ang II}$  ( $10^{-7}$  mol/L) 作用于细胞, 呈时间依赖性诱导肿瘤坏死因子转化酶 mRNA 的表达, 6 h 开始增加, 24 h 达峰, 之后逐渐减低, 差异具有显著性。结论 经佛波酯诱导分化后的人急性白血病单核细胞表达肿瘤坏死因子转化酶; 血管紧张素  $\text{Ang II}$  呈浓度和时间依赖性上调巨噬细胞肿瘤坏死因子转化酶 mRNA 表达。血管紧张素  $\text{Ang II}$  与肿瘤坏死因子转化酶可能共同参与了血管壁炎症和动脉粥样硬化进展。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Expression of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Converting Enzyme mRNA in AngiotensinII-stimulated THP-1 MacrophagesWU Chao-Neng<sup>1</sup>, PU Xiao-Qun<sup>2</sup>, FANG Cong-Feng<sup>1</sup>, JIANG Jian-Jun<sup>1</sup>, and TANG Li-Jiang<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, Taizhou Hospital, Wenzhou Medical College, Taizhou 317000, China; 2. Department of Cardiology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, 410078 China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Inflammation; AngiotensinII; PMA; Macrophages; Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Converting Enzyme; RT-PCR

[ABSTRACT] Aim To investigate the tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme (TACE) mRNA expression in angiotensin  $\text{Ang II}$  stimulated THP-1 macrophages to explore the relationship and their potential roles in atherosclerosis. Methods Cultured THP-1 was differentiated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 40 nmol/L) for 24 hours to macrophages, then stimulated with  $\text{Ang II}$  in different concentration ( $10^{-10} \sim 10^{-7}$  mol/L) and for different time (0, 6, 12, 24 h and 48 h). RT-PCR was used to measure the expression of TACE mRNA. Results TACE mRNA was expressed in THP-1 after differentiated to macrophages by PMA.  $\text{Ang II}$  ( $10^{-10} \sim 10^{-7}$  mol/L) increased TACE mRNA expression in a dose dependent way ( $P < 0.01$  vs control;  $P < 0.05$  vs  $10^{-7}$  mol/L). TACE mRNA was increased at 6 hours and with the highest level at 24 hours, then decreased ( $P < 0.01$  vs control;  $P < 0.05$  vs 24 h). Conclusions THP-1 macrophages express TACE.  $\text{Ang II}$  significantly upregulates TACE expression in a dose- and time dependent way.  $\text{Ang II}$  and TACE may play an important role in macrophage-mediated vascular inflammation and atherosclerosis progression.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是由多种病因造成的、始发于动脉壁内膜损伤的一种疾病。研究证实, As 是一种慢性炎症性疾病, 炎症已成为 As 关键的致病机制。血管紧张素  $\text{Ang II}$  (angiotensin,  $\text{Ang II}$ ) 是强烈的促炎因子之一, 它激活粥样斑块组织内的炎症细胞——巨噬细胞, 并上调炎症因子如肿瘤坏

死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 以及白细胞介素 6 (IL-6) 等的表达, 因而成为人们关注的焦点<sup>[1-3]</sup>。肿瘤坏死因子转化酶 (tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme, TACE) 是一类膜锚定的金属蛋白酶, 能从细胞膜表面水解释放 TNF- $\alpha$  及 IL-6 受体 (IL-6R) 等。关于  $\text{Ang II}$  对巨噬细胞表达 TACE 的作用研究, 目前国内外尚未见报道。本研究通过观察  $\text{Ang II}$  对巨噬细胞表达 TACE mRNA 的影响, 以期探讨  $\text{Ang II}$  与巨噬细胞表达 TACE 之间的关系及其在 As 发病中的地位。

[收稿日期] 2006-07-09 [修回日期] 2007-02-20

[作者简介] 吴超能, 硕士, 医师, 主攻冠心病发生机制与防治, 联系电话为 013757697519, E-mail 为 wuchaoneng@hotmail.com。蒲晓群, 教授, 硕士研究生导师, 主攻冠心病的发生机制与介入治疗。方崇峰, 副主任医师, 主攻冠心病介入治疗。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人急性白血病单核细胞株(THP-1 细胞),由武汉大学古典生物保藏中心提供,经佛波酯(PMA)诱导分化为巨噬细胞后用于实验。小牛血清购自上海Gibco公司;RPMI 1640培养基和Trizol抽提试剂购自Gibco公司;佛波酯和Ang II粉购自Sigma公司。PCR引物由上海生工生物工程公司合成。逆转录试剂盒购自MBI公司;PCR试剂盒购自大连宝生物工程有限公司。

### 1.2 细胞培养和诱导转化

细胞复苏成功后,培养瓶中加入含10%小牛血清的RPMI 1640完全培养基,置于含5%CO<sub>2</sub>、95%空气的培养箱中,37℃孵育。待细胞生长至接近融合时代代,2~3代后THP-1细胞用于实验。诱导转化时加入含有40 nmol/L PMA的RPMI 1640培养基,以促进单核细胞分化成巨噬细胞。24 h后,细胞分化为巨噬细胞。无血清培养基充分洗涤后,置于无PMA的培养基中24 h,开始后续试验。

### 1.3 实验分组和处理

**1.3.1 不同浓度的血管紧张素 II对巨噬细胞表达TACE的影响** 将培养的细胞分5组:对照组在培养基培养24 h,10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup>、10<sup>-9</sup>和10<sup>-10</sup> mol/L浓度组分别以相应浓度的Ang II刺激24 h,收集细胞,制备总RNA,行RT-PCR,分析TACE mRNA。

**1.3.2 不同时间点血管紧张素 II对巨噬细胞表达TACE的影响** 以1×10<sup>-7</sup> mol/L浓度的Ang II与THP-1巨噬细胞共同孵育,分别在0、6、12、24和48 h收集细胞,同上方法提取总RNA,RT-PCR法测TACE mRNA。

### 1.4 总RNA分离和RT-PCR

**1.4.1 RNA提取** Trizol抽提试剂常规提取细胞总RNA,经氯仿处理,异丙醇沉淀,75%乙醇洗涤后,略干燥,溶于20 μL DEPC处理水。经核酸紫外分析仪检测,根据A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>比值,确定样品中RNA纯度(A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>=1.7~1.8)和含量。

**1.4.2 mRNA逆转录反应** 20 μL反应体系中含1 μg总RNA,20 mg/L的oligo(dT)18引物,1 mmol/L dNTP,20 U RNA酶抑制剂,1×反应缓冲物,200I<sup>-</sup>MuL<sub>v</sub>逆转录酶。于PCR仪上42℃反应60 min,72℃灭活10 min,置冰浴。

**1.4.3 PCR反应** 反应体积25 μL,含1×PCR buffer,20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,200 μmol/L dNTP,2 U Taq DNA聚合酶,上下游引物各10 μmol/L,β-actin引物

10 μmol/L逆转录产物2 μL。PCR反应条件为:95℃预变性5 min→94℃变性45 s→58℃退火45 s→70℃延伸1 min,扩增至30个循环,72℃延伸10 min,4℃保存。TACE引物序列为:上游5'-GCA TTC TCA AGT CTC CAC AAG-3';下游5'-CCT CAT TCG GGG CAC ATT CTG-3',产物434 bp。β-actin上游5'-CGC TGC GCT GGT CGT CGA CA-3';下游5'-GTC AGG CAC GAT TTC CCG CT-3',产物619 bp。

**1.4.4 电泳鉴定** 取5 μL PCR扩增产物于含1.5%琼脂糖凝胶板稳压电泳(60 V×30 min),经数码凝胶图像定量分析系统成像、条带密度扫描,以β-actin为内参照,测定各样本TACE mRNA的相对表达量。

### 1.5 统计学处理

采用SPSS 11.0统计软件进行统计分析,各实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据比较在方差齐的前提下采用方差分析。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 THP-1细胞经佛波酯诱导分化前后的形态学变化

THP-1细胞被诱导分化前,细胞呈圆形,悬浮生长;以PMA处理24 h后,细胞由悬浮生长变为贴壁生长,且伸展伪足,成巨噬细胞外形(图1)。

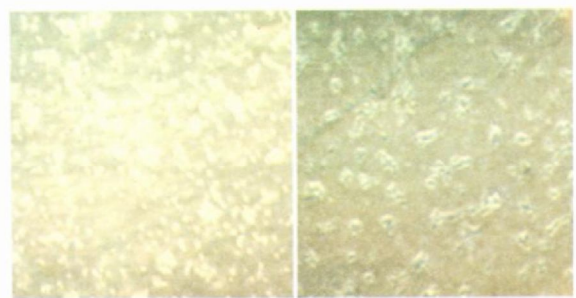


图1. THP-1细胞经佛波酯(40 nmol/L)诱导分化前后的形态学变化 左为分化前;右为分化后

### 2.2 不同浓度血管紧张素 II对巨噬细胞表达肿瘤坏死因子转化酶 mRNA的影响

对照组仅表达少量TACE,Ang II各浓度组TACE mRNA表达较对照组均明显增高( $P < 0.01$ );一定范围内TACE mRNA的表达呈浓度依赖性,以10<sup>-7</sup> mol/L浓度组作用最强,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ;图2)。

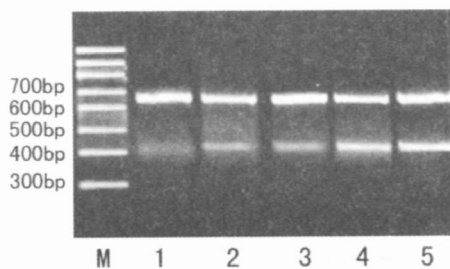


图 2. 不同浓度血管紧张素 II 对 THP-1 巨噬细胞肿瘤坏死因子转化酶 mRNA 表达的影响 1 为对照组; 2~ 5 为 Ang II 浓度  $10^{-10}$  ~  $10^{-7}$  mol/L.

表 1. 不同浓度血管紧张素 II 对 THP-1 巨噬细胞肿瘤坏死因子转化酶 mRNA 表达的影响

分 组	mRNA
对照组	0.22 ± 0.08
Ang II 组 (mol/L)	
$1 \times 10^{-10}$	0.65 ± 0.18 <sup>ab</sup>
$1 \times 10^{-9}$	0.73 ± 0.15 <sup>ab</sup>
$1 \times 10^{-8}$	0.82 ± 0.20 <sup>ab</sup>
$1 \times 10^{-7}$	0.96 ± 0.23 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与  $10^{-7}$  mol/L 组比较。

### 2.3 血管紧张素 II 作用 THP-1 巨噬细胞不同时间对肿瘤坏死因子转化酶 mRNA 表达的影响

将诱导分化后的 THP-1 细胞与  $10^{-7}$  mol/L 的 Ang II 共同培养, 6 h 后 THP-1 细胞 TACE mRNA 的表达开始增加, 差异具有显著性 ( $P < 0.01$ ); 12 h 表达继续上调, 24 h 左右达到最高峰, 而 48 h 的表达开始下调, 与 12 h 接近, 与对照组比较, 差异具有显著性 ( $P < 0.05$ )。如图 3 所示。

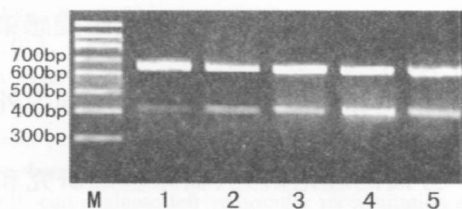


图 3. 血管紧张素 II 作用于 THP-1 细胞不同时间点肿瘤坏死因子转化酶 mRNA 表达的影响 1 为 0 h, 2~ 5 分别为 6、12、24 和 48 h。

## 3 讨论

肿瘤坏死因子转化酶(TACE)是第一个被鉴定出来的跨膜蛋白脱落酶,属于去整合素和金属蛋白

表 2. 血管紧张素 II 作用于 THP-1 细胞不同时间点肿瘤坏死因子转化酶 mRNA 表达的影响

分组 (h)	mRNA
0	0.19 ± 0.07 <sup>ab</sup>
6	0.61 ± 0.17 <sup>ab</sup>
12	0.80 ± 0.19 <sup>ab</sup>
24	1.02 ± 0.21 <sup>a</sup>
48	0.82 ± 0.14 <sup>ab</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与 24 h 组比较。

酶蛋白质家族成员,能水解膜结合型肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ ) A1a76-Val77 肽键并释放出可溶性 TNF,因而得名。TACE 能水解数种锚定于膜表面的细胞因子和受体如: TNF- $\alpha$ 、TNFR2、IL-6R、VCAM-1 和 CD40 等,并改变这些因子的生物活性,参与 As<sup>[4,5]</sup>。

血管紧张素 II 是致 As 的重要炎症因子,斑块内巨噬细胞合成并释放 Ang II, Ang II 又激活细胞,上调 TNF- $\alpha$  和 IL-6 等炎症因子的表达,并从脂质代谢、影响细胞外基质代谢以及增强细胞促凝活性等多方面来发挥作用<sup>[6]</sup>。本研究采用 THP-1 为实验对象<sup>[7]</sup>,发现经佛波酯(PMA)诱导分化的 THP-1 细胞表达 TACE,并且首次证实 Ang II 作用于 THP-1 巨噬细胞,呈浓度与时间依赖的方式促进 TACE mRNA 的表达。

文献报道,TACE 与 As 密切相关。在 As 斑块组织巨噬细胞聚集处,TACE 表达异常丰富,并同时伴有血清可溶性 TNF- $\alpha$ (sTNF- $\alpha$ )及其受体(sTNFR)的明显升高,而 TNF- $\alpha$  是促 As 进展的重要炎症因子<sup>[8,9]</sup>。TACE 还是水解细胞膜表面 IL-6R 形成可溶解形式(sIL-6R)的关键蛋白酶,sIL-6R/IL-6 复合体其活性显著增强,能进一步激活跨膜糖蛋白 130(gp130)所介导的信号传导通路,使转录激活因子-3(STAT3)磷酸化,导致炎症因子 IL-8 和 MCP-1 以及黏附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达上调,最终促使炎症细胞黏附、贴壁与移行,促进 As 进展<sup>[10,11]</sup>。本文研究结果表明,Ang II 能显著上调巨噬细胞 TACE 的表达。由于 TACE 对细胞膜表面炎症因子具有水解作用,因此,本结果提示: 在 As 的进展过程中,有可能存在有巨噬细胞相关的、由 TACE 介导的、Ang II 与 TNF- $\alpha$  及 IL-6 之间的炎症网络通路; ④TACE 可能是干预 Ang II 相关的炎症网络新的治疗靶点; ⑤由于阻断 Ang II 特异性受体的药物——Ang II 受体拮抗剂(ARB)具有抗动脉粥样硬化的作用,该类药能否通过抑制 TACE 的表达与活性来发挥抗炎作用,值得进一步研究。

关于 Ang Ⅱ 诱导 TACE 表达的机制,目前还不明确。文献报道,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是调节 TACE 活性的重要的信号通路,MAPK 的阻断剂可以降低 TACE 的剪切活性,而持续的激活 MAPK 可以增强 TACE 的活性<sup>[12]</sup>。有研究表明,MAPK 尤其是 p38MAPK,是参与炎症反应调控重要的信号分子,这提示 Ang Ⅱ 可能通过激活巨噬细胞 MAPK 炎症信号通路,进而诱导 TACE 表达。但是关于 Ang Ⅱ 是否通过 MAPK 通路来调节 TACE 的表达,还有待于进一步明确。

#### [参考文献]

- [1] Nobuhiko A, Suganuma E, Babaev VR, Fogo A, Swift LL, Linton MF, et al. Angiotensin II amplifies macrophage-driven atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24**: 2 143-148.
- [2] Arenas IA, Xu Y, Lopez-Jaramillo P, Davidge ST. Angiotensin II induced MMP-2 release from endothelial cells is mediated by TNF- $\alpha$  [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, **286**: C779-C784.
- [3] Cui R, Tieu B, Recinos A, Tilton RG, Brasier AR. RhoA mediates angiotensin II-induced phospho-Ser536 nuclear factor kappaB/RelA subunit exchange on the interleukin-6 promoter in VSMC [J]. *Circ Res*, 2006, **99** (7): 723-730.
- [4] Fernandez-Real JM, Lainez B, Vendrell J, Rigla M, Castro A, Penarroja G, et al. Shedding of TNF- $\alpha$  receptors, blood pressure, and insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, **282**: E952-E959.
- [5] Canault M, Peiretti F, Kopp F, Bonardo B, Bonzi MF, Coudeyre JC, et al. The TNF alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) is expressed in the atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice: possible contribution to elevated plasma levels of soluble TNF alpha receptors [J]. *Atherosclerosis*, 2006, **187** (1): 82-91.
- [6] 吴超能, 蒲晓群. 血管紧张素 Ⅱ-巨噬细胞与急性冠脉综合征 [J]. *心血管病学进展*, 2004, **25** (6): 447-450.
- [7] Rival Y, Beneteau N, Chaptuis V, Taillandier T, Lestienne F, Dupont-Passelunig E, et al. Cardiovascular drugs inhibit MMP-9 activity from human THP-1 macrophages [J]. *DNA Cell Biol*, 2004, **23** (5): 283-292.
- [8] Canault M, Peiretti F, Kopp F, Bonardo B, Bonzi MF, Coudeyre JC, et al. The TNF alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) is expressed in the atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice: Possible contribution to elevated plasma levels of soluble TNF alpha receptors [J]. *Atherosclerosis*, 2006, **187** (1): 82-91.
- [9] Valgimigli M, Ceconi C, Malagutti P, Merli E, Soukhomovskaia O, Francolini G, et al. Tumor necrosis factor-receptor 1 is a major predictor of mortality and new-onset heart failure in patients with acute myocardial infarction: the cytokine activation and long-term prognosis in myocardial infarction (C-ALPHA) study [J]. *Circulation*, 2005, **111**: 863-870.
- [10] Klouche M, Bhakdi S, Hemmes M, Rose-John S. Novel Path to Activation of Vascular Smooth Muscle Cells: Up-Regulation of gp130 Creates an Autocrine Activation Loop by IL-6 and Its Soluble Receptor [J]. *J Immunol*, 1999, **163**: 4 583-589.
- [11] Garton KJ, Gough PJ, Philalay J, Wille PT, Blobel CP, Whitehead RH, et al. Stimulated Shedding of Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) Is Mediated by Tumor Necrosis Factor-converting Enzyme (ADAM 17) [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 37 459-464.
- [12] Heidinger M, Kolb H, Krell HW, Jochum M, Ries C. Modulation of autocrine TNF- $\alpha$  stimulated matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) expression by mitogen-activated protein kinases in THP-1 monocytic cells [J]. *Biol Chem*, 2006, **387** (1): 69-78.

(此文编辑 李小玲)

## 《中华现代内科学杂志》征稿

《中华现代内科学杂志》为中华临床医药学会主办的内科专业学术刊物。本刊为月刊,具有 ISSN/CN 标准刊号,ISSN 1681-6676 CN 98-0323/R;被美国化学文摘(CODEN:ZXNZAY)、波兰哥白尼索引、中文生物医学期刊文献数据库、中国生物医学期刊引文数据库、国家科技部《中文科技期刊数据库》、中华首席医学网等收录,国内外读者均可以在中华首席医学网免费阅读杂志全文。

主要栏目:专论、内科论坛、论著、综述与讲座、临床医学、经验交流、心电图分析、临床病理(病例)讨论、实验研究、中西医结合、中医中药、特检与临床、药物与临床、内科护理、误诊分析、病例报告、医院感染地等。

本刊欢迎如下稿件:

1、有实际指导意义的述评、临床研究、经验介绍、临床病理(例)讨论和病例报告,以及反映国内外内科重要进展的文献综述等。

2、探讨大内科领域(心血管内科、神经内科、血液内科等)某一方面的理论研究、临床基础研究和实验研究工作成果的论文。

3、中医药、中西医结合防治常见内科疾病的经验和科研成果。

4、新技术、新疗法、新器械的创制,书评,学术讨论、学术动态等。

本刊发表周期短,免收审稿费。论文发表后颁发论文证书。对省/部级以上部门科研基金资助项目的论文优先刊登。欢迎投稿!

投稿信箱:北京市海淀区 83-106 信箱《中华现代内科学杂志》编辑部;邮编:100083;E-mail 为 neikexue@sohu.com;电话为 010-62242528;传真为 010-62245829;网址:www.shouxi.net&www.cmmj.net;网络实名:首席医学网。