

[文章编号] 1007-3949(2010)18-03-0169-04

· 实验研究 ·

不对称二甲基精氨酸对 THP-1源性巨噬细胞表达巨噬细胞移动抑制因子的影响

崔璐华^{1,2}, 王庸晋², 王金胜², 王治平³, 李启富³

(1. 山西医科大学第一医院, 山西省太原市 030001; 长治医学院 2 心血管病研究所, 3 附属和平医院, 山西省长治市 046000)

[关键词] 不对称二甲基精氨酸; THP-1; 巨噬细胞移动抑制因子; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 研究不对称二甲基精氨酸对 THP-1源性巨噬细胞表达巨噬细胞移动抑制因子的影响。方法 150 nmol/L 佛波酯诱导 THP-1细胞 48 h使其转化为巨噬细胞,并用抗人 CD68进行免疫细胞化学鉴定,以不同浓度的不对称二甲基精氨酸(1、5、10、20和 30 μ mol/L)作用于 THP-1源性巨噬细胞 24 h及 20 μ mol/L 不对称二甲基精氨酸作用于 THP-1源性巨噬细胞 0 h、6 h、12 h、24 h及 48 h 逆转录聚合酶链反应检测各组细胞的巨噬细胞移动抑制因子 mRNA 表达水平,酶联免疫吸附法检测各组细胞上清液中巨噬细胞移动抑制因子的蛋白含量。结果 与对照组相比,5、10、20和 30 μ mol/L 的不对称二甲基精氨酸作用于 THP-1源性巨噬细胞 24 h后,巨噬细胞移动抑制因子的 mRNA 和蛋白表达水平均明显提高($P < 0.05$)。与 0 h组相比,20 μ mol/L 不对称二甲基精氨酸作用于 THP-1源性巨噬细胞 12、24和 48 h 巨噬细胞移动抑制因子的 mRNA 和蛋白表达水平均明显提高($P < 0.05$)。结论 不对称二甲基精氨酸可上调 THP-1源性巨噬细胞的巨噬细胞移动抑制因子表达,并呈剂量和时间依赖性,不对称二甲基精氨酸可能通过诱导巨噬细胞移动抑制因子的表达而促进动脉粥样硬化的发生和发展。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Asymmetric Dimethylarginine on the Expression of Macrophage Migration Inhibitory Factor in THP-1 Monocyte-Derived Macrophage Cells

CUI Lu-Hua^{1,2}, WANG Yong-Jin², WANG Jin-Sheng², WANG Zhi-Ping³, and LI Qi-Fu³

(1. The First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 2. Institute of Cardiovascular Diseases, 3. Affiliated He Ping Hospital, Changzhi Medical College, Changzhi, Shanxi 046000, China)

[KEY WORDS] Asymmetric dimethylarginine; THP-1; Macrophage Migration Inhibitory Factor; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of asymmetric dimethylarginine (ADMA) on the expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in THP-1 monocyte-derived macrophage cells. **Methods** After induced by 150 nmol/L phorbol 12 myristate 13 acetate (PMA) for 48 h, THP-1 monocyte cells differentiated into macrophage cells.

And THP-1 monocyte-derived macrophage cells were identified by immunocytochemistry with anti-human CD68. After THP-1 monocyte-derived macrophage cells were incubated with ADMA of different concentrations (1 μ mol/L, 5 μ mol/L, 10 μ mol/L, 20 μ mol/L, 30 μ mol/L) for 24 h and 20 μ mol/L ADMA for 0 h, 6 h, 12 h, 24 h and 48 h, the expressions of MIF in mRNA and protein were measured by means of RT-PCR and enzyme-linked immunosorbent assay respectively.

Results Treatments of THP-1 macrophage cells with 5 μ mol/L, 10 μ mol/L, 20 μ mol/L, 30 μ mol/L ADMA for 24 h resulted in an increase in the mRNA and protein levels of MIF. Treatments of THP-1 macrophage cells with 20 μ mol/L ADMA for 12 h, 24 h, 48 h, resulted in an increase in the mRNA and protein levels of MIF.

Conclusion ADMA upregulated the expression levels of MIF in cultured THP-1 monocyte-derived macrophage cells in a dose- and time-dependent manner, which may result in the atherosclerosis.

目前,不对称二甲基精氨酸(ADMA)作为内源性一氧化氮合酶抑制剂已逐渐被认为是动脉粥样硬化(As)的一个独立危险因素,但 ADMA 在 As 过程中对单核巨噬细胞作用尚不明确。越来越多研究表

明,巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)作为一种重要的炎症因子,在 As 的发生过程中起着重要的作用。本文通过研究 ADMA 作用于巨噬细胞后对 MIF 表达的影响,进一步探讨 ADMA 对单核巨噬细胞的作用。

[收稿日期] 2009-12-29 [修回日期] 2010-03-10

[基金项目] 国家自然科学基金(30840043)和山西省高校科技项目(20081033)

[作者简介] 崔璐华,硕士研究生,研究方向为动脉粥样硬化, E-mail 为 trenwz@sina.com。通讯作者王庸晋,博士,教授,博士生导师,研究方向为血脂代谢与动脉粥样硬化的发病机制, E-mail 为 yongjiwang2008@sohu.com。

1 材料和方法

1.1 主要材料

THP-1细胞购自中科院上海生命科学研究院。

RPM 11640培养基和胎牛血清购自 Invitrogen Corporation, 佛波酯及 ADMA 购自 Sigma 公司, MIF 试剂盒购自 R&D 公司, 总 RNA 提取试剂盒购自 NERON Biotechnology 公司, RT-PCR 试剂盒购自南京凯基公司, PCR 引物由上海生工合成, PV-9000 二步法免疫组织化学检测试剂及 DAB 试剂盒均为北京中杉金桥产品, 鼠抗人 CD68 单克隆抗体购自广州深达生物制品技术有限公司。

1.2 THP-1 细胞培养

细胞复苏后, 用含 10% 胎牛血清的 RPM 11640 完全培养基在 37℃、5% CO₂ 的环境下培养, 在对数生长期以 4×10^5 /L 的密度接种于 6 孔板, 用 150 nmol/L 佛波酯诱导 THP-1 细胞 48 h 使其转化为巨噬细胞, 换含 1% 胎牛血清的 RPM 11640 培养基继续培养 12 h 以达细胞同步化, 然后随机分组进行实验。

1.3 实验分组

(1) 量效实验: 对照组不做任何处理; ADMA 组分别用 1、5、10、20 和 30 μ mol/L 的 ADMA 孵育 THP-1 源性巨噬细胞 24 h。(2) 时效实验: 对照组为 20 μ mol/L ADMA 作用 THP-1 源性巨噬细胞 0 h, ADMA 组用 20 μ mol/L ADMA 孵育 THP-1 源性巨噬细胞 6 h、12 h、24 h 和 48 h。

1.4 细胞免疫化学鉴定巨噬细胞

佛波酯与 THP-1 细胞共孵育 48 h 后, 用抗人 CD68 进行免疫细胞化学鉴定, 操作步骤按照免疫组织化学试剂盒说明书进行。

1.5 酶联免疫吸附试验检测巨噬细胞移动抑制因子含量

收集各孔细胞上清液, 以 ELISA 法检测 MIF 含量, 操作按照试剂盒说明书进行。

1.6 逆转录聚合酶链反应检测巨噬细胞移动抑制因子 mRNA 表达

收集各孔细胞, 用总 RNA 抽提取试剂盒提取细胞总 RNA 后, 核酸分析仪检测其浓度及纯度, 取 1 μ g RNA 进行逆转录反应, 合成 cDNA, 再取 4 μ L cDNA 进行 PCR 反应。MIF 上游引物为 5'-GCA TCA GCC CGG ACA GGG TC -3', 下游引物为 5'-CCG TTT ATT TCT CCC CAC CAG AAG G -3', 扩增片长 189 bp。β-actin 上游引物为 5'-CTC CAT CCT GGC CTC GCT GT-3', 下游引物为 5'-GCT GTC ACC CTT CAC CGT TCC-3', 扩增片长 359 bp。反应条件为 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。反应结束后用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电

泳, 凝胶成像系统扫描并分析, 结果以 MIF 与 β-actin 电泳条带的平均光密度值之比表示。

1.7 统计学分析

采用 SPSS16.0 统计软件进行分析, 定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析和 LSD 检验, 以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 佛波酯诱导前后 THP-1 细胞的形态学变化

THP-1 细胞与 150 nmol/L 佛波酯共孵育 48 h 后, 逐渐伸出突起, 由原来的圆形、悬浮生长转变为多角形、梭形, 富含颗粒, 呈阿米巴样贴壁生长的巨噬细胞, 转化率超过 95% (图 1)。

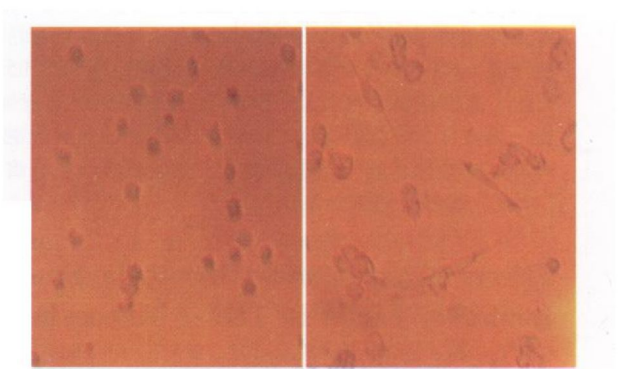


图 1 倒置显微镜下佛波酯诱导前后 THP-1 细胞的形态变化 (10×20) 左为诱导前, 右为诱导后。

2.2 免疫细胞化学鉴定巨噬细胞

THP-1 细胞与 150 nmol/L 佛波酯共孵育 48 h 后, 免疫细胞化学结果显示 95% 以上的细胞胞浆内可见棕黄色颗粒, 表明与 150 nmol/L 佛波酯共孵育 48 h 后, THP-1 细胞已经转化为巨噬细胞 (图 2)。

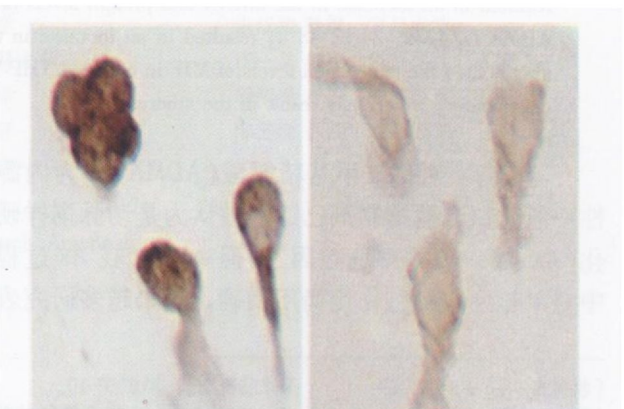


图 2 佛波酯诱导 THP-1 细胞 48 h 后 CD68 的表达 (10×40) 左为阳性反应, 右为阴性对照。

2 3 不同浓度不对称二甲基精氨酸对 THP-1 源性巨噬细胞巨噬细胞移动抑制因子表达的影响

与对照组相比, 5、10、20 和 30 $\mu\text{mol/L}$ ADMA 处理 THP-1 源性巨噬细胞 24 h 后, MIF 的蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05$), 呈剂量依赖性 (表 1)。与之一致的是, 与对照组相比, 5、10、20 和 30 $\mu\text{mol/L}$ ADMA 作用 THP-1 源性巨噬细胞 24 h 后, MIF 的 mRNA 表达水平呈上升趋势, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且呈剂量依赖性 (表 1 和图 3)。

表 1 不同浓度不对称二甲基精氨酸对 THP-1 源性巨噬细胞表达巨噬细胞移动抑制因子的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

ADMA 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	MIF 含量 (ng/L)	MIF mRNA
0(对照组)	76.0 \pm 4.0	0.69 \pm 0.10
1	86.0 \pm 5.3	0.71 \pm 0.09
5	119.0 \pm 3.5 ^a	0.80 \pm 0.03 ^{ab}
10	160.0 \pm 8.6 ^{abc}	0.98 \pm 0.03 ^{abc}
20	242.0 \pm 31.8 ^{abcd}	1.04 \pm 0.01 ^{abcd}
30	147.0 \pm 48.6 ^{abc}	1.02 \pm 0.01 ^{abc}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$ 与 1 $\mu\text{mol/L}$ ADMA 组相比; c 为 $P < 0.05$ 与 5 $\mu\text{mol/L}$ ADMA 组相比; d 为 $P < 0.05$ 与 10 $\mu\text{mol/L}$ ADMA 组相比。

2 4 不对称二甲基精氨酸作用 THP-1 源性巨噬细胞不同时间后对巨噬细胞移动抑制因子表达的影响

与对照组相比, 20 $\mu\text{mol/L}$ ADMA 作用 THP-1 源性巨噬细胞 12 h、24 h 和 48 h 后 MIF 的蛋白表达

水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 呈明显时间依赖性 (表 2)。与之一致的是, 与对照组比较, 20 $\mu\text{mol/L}$ ADMA 作用 THP-1 源性巨噬细胞 12 h、24 h 和 48 h 后, MIF 的 mRNA 表达水平呈上升趋势, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 呈明显时间依赖性 (表 2 和图 4)。

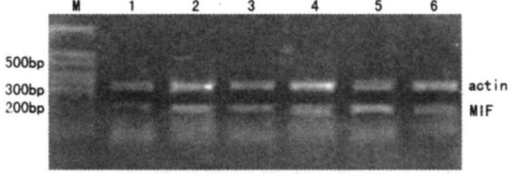


图 3 不同浓度不对称二甲基精氨酸对 THP-1 源性巨噬细胞表达巨噬细胞移动抑制因子的影响 M 为 Marker, 1 为对照组, 2~6 依次为 1、5、10、20 和 30 $\mu\text{mol/L}$ ADMA 作用组。

表 2 20 $\mu\text{mol/L}$ 不对称二甲基精氨酸作用 THP-1 源性巨噬细胞不同时间后对巨噬细胞移动抑制因子表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

ADMA 作用时间	MIF 含量 (ng/L)	MIF mRNA
0 h (对照组)	83.0 \pm 20.0	0.84 \pm 0.06
6 h	114.0 \pm 9.4	0.89 \pm 0.09
12 h	132.0 \pm 4.7 ^a	1.04 \pm 0.02 ^{ab}
24 h	248.0 \pm 34.7 ^{abc}	1.08 \pm 0.02 ^{ab}
48 h	156.0 \pm 40.6 ^{ab}	1.06 \pm 0.03 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$ 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$ 与 6 h 组相比; c 为 $P < 0.05$ 与 12 h 组相比。

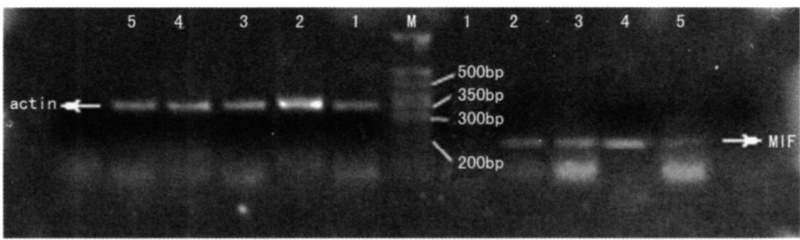


图 4 20 $\mu\text{mol/L}$ 不对称二甲基精氨酸作用 THP-1 源性巨噬细胞不同时间后对巨噬细胞移动抑制因子表达的影响 M 为 Marker, 1 为对照组, 2~5 分别为 ADMA 作用 6 h、12 h、24 h 和 48 h。

3 讨论

ADMA 作为一种强烈的内源性竞争性一氧化氮合酶抑制剂, 不仅可通过影响一氧化氮的合成和生物利用度, 还可通过加强氧化应激, 导致内皮功能障碍, 进一步引起动脉粥样硬化的发生和发展。研究显示, ADMA 不仅作用于血管内皮细胞还可作用于单核巨噬细胞, 促进单核细胞对内皮细胞的黏附作

用以及组织因子的分泌, 进一步促进 As 的发生^[1-3]。目前, ADMA 被认为是动脉粥样硬化的一个独立危险因素^[4]。

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病, MIF 作为一种重要的炎症因子, 在 As 的发生发展过程中发挥重要作用。近来众多的研究发现, MIF 不仅在某些急慢性炎症 (感染性休克、类风湿性关节炎等) 中起重要作用, 而且还与心血管疾病之间存在密切关

系^[5]。人体以及动物实验研究发现, MIF的表达和血管内膜中膜厚度以及脂质沉积存在明显的相关性^[6-7]。研究发现, MIF可通过上调基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases MMP)的表达来降解胶原蛋白, 削弱纤维帽, 从而增加斑块的不稳定性^[8-9]。此外, 最近有研究报道, 人群中存在的某些 MIF等位基因多态性可能增加了动脉粥样硬化和急性心肌梗死的易感性^[10-11]。

Schmeisser等^[12]研究发现, 众多致动脉粥样硬化因素如血管紧张素、缺氧等可诱导动脉粥样硬化斑块中 MIF的表达, 从而导致斑块的不稳定性。本研究通过 150 nmol/L 佛波酯诱导 THP-1 细胞 48 h 后, THP-1 细胞从形态上由圆形悬浮生长转变为多角形, 呈阿米巴样贴壁生长的巨噬细胞, 并用抗人 CD68 免疫细胞化学进一步得到鉴定。5、10、20 和 30 μ mol/L ADMA 作用于体外培养的 THP-1 源性巨噬细胞 24 h 以及 20 μ mol/L ADMA 作用于体外培养 THP-1 源性巨噬细胞 12 h、24 h 和 48 h, MIF 基因以及蛋白表达水平均明显升高。表明 ADMA 可诱导巨噬细胞 MIF 的表达, 并呈现剂量和时间依赖性。证明 ADMA 作为一种动脉粥样硬化危险因素可诱导 MIF 的表达, 并可能进而导致动脉粥样硬化的发生发展。

本实验结果显示, 通过体外培养 THP-1 源性巨噬细胞, ADMA 可明显诱导 MIF 的表达。然而, 在体内 ADMA 是否也可诱导 MIF 的表达以及 ADMA 是否可通过抑制一氧化氮合成和加强氧化应激来诱导 MIF 表达, 仍需进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] Zoltan Veresh, Anita Racsz, Gabor Lotz, et al. ADMA impairs nitric oxide-mediated arteriolar function due to increased superoxide production by angiotensin NAD(P)H oxidase pathway [J]. *Hypertension*, 2008, **52**: 960-966
- [2] Chen ME, Li YJ, Yang TL, et al. ADMA induces monocyte adhesion via activation of chemokine receptors in cultured THP-1 cells [J]. *Cytokine*, 2008, **(43)**: 149-159
- [3] Jiang DJ, Cao YQ, Xin HY, et al. Asymmetric dimethylarginine induces tissue factor expression in monocytes via NF-kappaB-dependent pathway: role in acute coronary syndromes [J]. *Atherosclerosis*, 2008, **12**: 24
- [4] 吴宗虎, 蒲晓群, 孙宝贵. 冠心病患者内源性一氧化氮合酶抑制物的异常增高及临床意义 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (12): 923-925
- [5] 徐斌, 尹彤, 赵玉生. 巨噬细胞移动抑制因子在动脉粥样硬化中的作用研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (2): 238-240
- [6] Korshunov VA, Nkonenko TA, Tkachuk VA, et al. Interleukin-18 and macrophage migration inhibitory factor are associated with increased carotid intima-media thickening [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26** (2): 295-300
- [7] Burger-Kentischer A, Goebel H, Seiler R, et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor in different stages of human atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2002, **105** (13): 1561-566
- [8] Schrans-Stassen BH, Lue H, Sonnenmans DC, et al. Stimulation of vascular smooth muscle cell migration by macrophage migration inhibitory factor [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, **7** (9-10): 1211-216
- [9] Kong YZ, Yu XY, Tang JJ, et al. Macrophage migration inhibitory factor induces MMP-9 expression: implications for destabilization of human atherosclerotic plaques [J]. *Atherosclerosis*, 2005, **(178)**: 207-215
- [10] Tereshchenko Irina P, Jana Petkova, Frantisek M razek, et al. The macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene polymorphism in Czech and Russian patients with myocardial infarction [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2009, **(402)**: 199-202
- [11] Christian Herder, Thomas Illig, Jens Baumert, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) and risk for coronary heart disease: results from the MONICA/KORA Augsburg case-cohort study, 1984-2002 [J]. *Atherosclerosis*, 2008, **(200)**: 380-388
- [12] Schmeisser A, Marquetant R, Illmer T, et al. The expression of macrophage migration inhibitory factor 1 alpha (MIF 1 alpha) in human atherosclerotic plaques is induced by different proatherogenic stimuli and associated with plaque instability [J]. *Atherosclerosis*, 2005, **178** (1): 83-94

(此文编辑 许雪梅)