

不同浓度的血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 、血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I-7})$ 对 THP-1巨噬细胞过氧化体增殖物激活型受体 $\text{PPAR}\gamma$ 表达的影响

亢小红, 杨志明, 边云飞, 康玉明, 李 慧

(山西医科大学第二附属医院内科, 山西省太原市 030001)

[关键词] 代谢综合征; 巨噬细胞; 血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$; 血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I-7})$; 过氧化体增殖物激活型受体

[摘要] 目的 观察不同浓度血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 、血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I-7})$ 对单核细胞源性巨噬细胞过氧化体增殖物激活型受体 $\text{PPAR}\gamma$ 表达的影响。方法 体外培养原代 THP-1细胞, 取 5~8代细胞用佛波酯诱导分化为巨噬细胞, 将细胞分成空白对照组(不加任何处理因素)、不同浓度(0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$)血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I-7})$ 组和不同浓度(0.1、1、5和 10 $\mu\text{mol/L}$)血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 组加入相应处理因素培养 48 h后, RT-PCR法和免疫印迹法分别检测过氧化体增殖物激活型受体 $\text{PPAR}\gamma$ 的 mRNA和蛋白表达。结果 不同浓度血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I-7})$ 组过氧化体增殖物激活型受体 $\text{PPAR}\gamma$ 的 mRNA及蛋白表达均比空白对照组显著升高($P < 0.05$), 而且随着血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I-7})$ 浓度的升高, 其 mRNA及蛋白的表达也升高($P < 0.05$); 而不同浓度血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 组过氧化体增殖物激活型受体 $\text{PPAR}\gamma$ 的 mRNA及蛋白表达均较空白对照组降低($P < 0.05$), 且过氧化体增殖物激活型受体 $\text{PPAR}\gamma$ 的 mRNA及蛋白表达随着血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 浓度的升高而降低($P < 0.05$)。结论 血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I-7})$ 呈浓度依赖性促进 THP-1巨噬细胞过氧化体增殖物激活型受体 $\text{PPAR}\gamma$ 的表达; 血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 呈浓度依赖性抑制 THP-1巨噬细胞过氧化体增殖物激活型受体 $\text{PPAR}\gamma$ 的表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Angiotensin $\text{Ang}(\text{I})$ and Angiotensin-(1-7) at Different Concentrations on Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ Expression in THP-1 Macrophage

KANG XiaoHong YANG ZhiMing BIAN Yun-Fei KANG Yu-Ming and LI Hui

(Department of Cardiovascular, Second Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] Metabolic Syndrome Macrophages Angiotensin $\text{Ang}(\text{I})$ Angiotensin-(1-7); Peroxisome Proliferator Activated Receptors

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of angiotensin $\text{Ang}(\text{I})$, angiotensin-(1-7) ($\text{Ang}(\text{I-7})$) at different concentrations on the expression of peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) in cultured human THP-1 macrophages. **Methods** Monocytic THP-1 cells were cultured with 100 nmol/L phorbol myristate acetate (PMA) for 48 hours to lead cells into THP-1 macrophage. Handle the cells in different conditions for 24 hours medium added nothing different concentration of $\text{Ang}(\text{I-7})$ (0.1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$), different concentration of $\text{Ang}(\text{I})$ (0.1, 1, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$).

mRNA and protein expression of PPAR γ in THP-1 macrophages was measured by RT-PCR and Western Blotting respectively. **Results** Compared with control group mRNA and protein expression of PPAR γ were increased in $\text{Ang}(\text{I-7})$ groups and they both expressed more as concentration of $\text{Ang}(\text{I-7})$ increasing (0.1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$). mRNA and protein expressions of PPAR γ were decreased in $\text{Ang}(\text{I})$ groups compared with control group and the mRNA and protein both expressed less as concentration of $\text{Ang}(\text{I})$ increasing (0.1, 1, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$) ($P < 0.05$). **Conclusion** $\text{Ang}(\text{I-7})$ can increase PPAR γ expression in THP-1 macrophages in dose-dependent manners. $\text{Ang}(\text{I})$ can decrease PPAR γ expression in dose-dependent manners.

[收稿日期] 2011-03-09

[作者简介] 亢小红, 硕士研究生。杨志明, 硕士, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为冠心病的基础与临床。边云飞, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为冠心病的基础与临床。

过氧化体增殖物激活型受体 (peroxisome proliferator activated receptors PPAR) 作为核受体转录因子家族成员已被证实参与调节胰岛素抵抗、高血压病、高脂血症、肥胖和炎症中发挥关键作用^[1-3], 并参与血压调节和血管炎症^[4]。在过去的十年里, 有关 PPAR γ 与代谢综合征的关系的研究取得了突破性

进展, PPAR γ 与代谢综合征的很多方面均有关。在动脉粥样硬化形成过程中,通过活化 PPAR γ 肝 X 受体 (LXR) -ABAC1 途径,最终引起巨噬细胞胆固醇流出增加^[5]。PPAR γ 还能抑制平滑肌细胞增殖、增加单核细胞凋亡、抑制粥样硬化斑块中基质金属蛋白酶 9 的表达,从而达到抑制和稳定粥样硬化斑块的作用。此外,PPAR γ 激动剂能减少在炎症状态下全身炎症产物的生成。血管紧张素-(1-7) [Ang (1-7)] 具有舒张血管、降低血压、利尿、抑制心肌细胞肥大、抑制血管平滑肌细胞和心脏成纤维细胞增殖等作用,且在体内外能拮抗血管紧张素 ① (Ang ①) 的活性^[6-8]。本实验通过研究不同浓度的 Ang ① 、Ang(1-7) 对 THP-1 巨噬细胞 PPAR γ 表达的影响,进一步了解 Ang ① 、Ang(1-7) 在动脉粥样硬化形成中对 THP-1 细胞的作用,启发我们进一步研究它对代谢综合征各个方面的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

人 THP-1 单核细胞购自中国科学院上海细胞库; RPM I1640 培养基、胰蛋白酶为美国 GIBCO 公司产品, Ang ① 、Ang(1-7)、A-779 佛波酯为美国 Sigma 公司产品; 总 RNA 提取试剂盒 (Trizol) 为美国 Promega 公司产品。胎牛血清购自杭州四季青公司。引物购自大连宝生物有限公司, PCRM ark 购自上海生物工程有限公司, 羊抗人 PPAR γ 一抗购自美国 Santa cruz 公司, 兔抗羊二抗购自武汉博士德公司, 硝酸纤维素膜购自 S & S 公司。

1.2 细胞培养和分组

THP-1 单核细胞用含 10% 小牛血清的 RPM I1640 培养基培养, 培养基中加入青霉素和链霉素各 0.06 g/L, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中静置培养。视细胞生长情况给予换液及传代, 取生长良好的 5~8 代细胞进行实验。每次实验前用 100 nmol/L 佛波酯孵育 THP-1 细胞 48 h 使其诱导分化成巨噬细胞。换用无血清培养基培养 3~5 h 后加处理因素。实验分为: 空白对照组, 无血清培养基培养 24 h; ④不同浓度 Ang(1-7) 组, 分别在 0.1、1 和 10 μ mol/L Ang(1-7) 环境中培养 24 h; ④不同浓度 Ang ① 组, 分别在 0.1、1、5、10 μ mol/L Ang ① 环境中培养 24 h。

1.3 逆转录聚合酶链反应检测 PPAR γ mRNA 的表达

收集各组细胞, 按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA。取各组细胞总 RNA 5 μ g 逆转录合成 cDNA, 再取逆转录产物 10 μ L 进行 PCR 循环。94℃温育 5

min, 94℃变性 1 min, 54℃复性 1 min, 72℃延伸 1 min, 共 34 个循环, 末次 72℃延伸 5 min。PPAR γ 的引物序列 (NCBI Reference Sequence NM_015869.4) 为上游 5'-GCT GTG CAG GAG ATC ACA GA-3', 下游 5'-CAC AGC AAA CTC AAA CTT GGG-3', 产物长度为 202 bp。人 GAPDH 引物为上游 5'-CATCTCTT-GCTCGAAGTCCA-3', 下游 5'-ATCATGTTTGAGAC-CITCAACA-3', 产物长度为 246 bp。反应结束后, 取反应产物 10 μ L 与 0.25% 溴酚蓝 2 μ L 混匀, 加入 1/6 上样缓冲液, 混匀后用移液枪加入样品孔中, 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, UVP 型凝胶图像分析系统采集凝胶电泳图, 并分析各组目的基因及 GAPDH 基因灰度值, 以二者的比值代表 PPAR γ 的相对表达水平。

1.4 免疫印迹法检测 PPAR γ 蛋白的表达

在收获好的细胞中加入三去污剂裂解缓冲液进行细胞裂解, 于 4℃离心 10 min, 弃除沉淀, BCA 法进行蛋白质定量, 取 50 μ g 蛋白质加入 2 \times SDS 凝胶加样缓冲液中, 100℃加热 10 min 以使蛋白质变性。用 6% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离, 转 PDVF 膜, 丽春红染色观察转膜效果, 并确定蛋白质分子量标准位置。封闭液封闭 2 h, 按 1:200 加入羊抗人 PPAR γ 一抗, 4℃孵育过夜, TBST 洗 3 次, 1:2000 加入辣根过氧化物酶标记兔抗羊二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 用蛋白印迹荧光检测试剂盒显示于 X 光片。以对照组的面积灰度值为 100% 与实验组进行比较和半定量分析。

1.5 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析及 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 THP-1 细胞的转化

与佛波酯孵育 72 h 后, THP-1 细胞由悬浮向贴壁转化, 呈阿米样贴壁生长, 伸出伪足, 富含颗粒, 具有巨噬细胞的特点, 转化率超过 85% (图 1)。

2.2 不同浓度 Ang(1-7) 和 Ang ① 对细胞 PPAR γ mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果表明, Ang(1-7) 呈浓度梯度促进 PPAR γ mRNA 表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2 和表 1); Ang ① 呈浓度梯度抑制 PPAR γ mRNA 表达, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2 和表 2)。

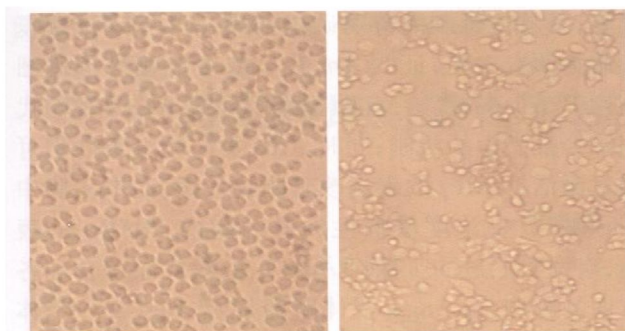


图 1 THP-1细胞的转化 左为 THP-1单核细胞,右为巨噬细胞。

Figure 1 Transformation of THP-1 macrophages

2.3 不同浓度 Ang(1-7)和 Ang^②对细胞 PPAR γ 蛋白表达的影响

Ang(1-7)呈浓度梯度促进 PPAR γ 蛋白表达,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 图 3和表 1); Ang^②呈浓度梯度抑制 PPAR γ 蛋白表达,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 图 4和表 2)。

表 1 不同浓度 Ang(1-7)对 THP-1细胞 PPAR γ mRNA 和蛋白表达的影响 ($n = 5$)

Table 1 Effect of Ang(1-7) at different concentrations on expressions of PPAR γ mRNA and protein in THP-1 macrophages

Ang(1-7)浓度	PPAR γ mRNA	PPAR γ 蛋白
0(空白对照组)	0.80380 \pm 0.05711	1.36260 \pm 0.05423
0.1 μ mol/L	0.91720 \pm 0.03716 ^a	1.46300 \pm 0.08724 ^a
1 μ mol/L	1.13640 \pm 0.09146 ^{ab}	1.52940 \pm 0.05557 ^{ab}
10 μ mol/L	1.21520 \pm 0.11534 ^{ac}	1.62160 \pm 0.02012 ^{ac}

a为 $P < 0.05$ 与空白对照组比较; b为 $P < 0.05$ 与 0.1 μ mol/L Ang(1-7)组比较; c为 $P < 0.05$ 与 1 μ mol/L Ang(1-7)组比较。

表 2. 不同浓度 Ang^②对 THP-1细胞 PPAR γ mRNA 和蛋白表达的影响 ($n = 5$)

Table 2. Effect of Ang^② at different concentrations on expressions of PPAR γ mRNA and protein in THP-1 macrophages

Ang ^② 浓度	PPAR γ mRNA	PPAR γ 蛋白
0(空白对照组)	0.80380 \pm 0.05711	/
0.1 μ mol/L	0.58560 \pm 0.01518 ^a	2.13020 \pm 0.04878
1 μ mol/L	0.49320 \pm 0.03916 ^{ab}	1.80560 \pm 0.04054 ^b
5 μ mol/L	0.29300 \pm 0.02334 ^{ac}	1.51060 \pm 0.07289 ^c
10 μ mol/L	0.00360 \pm 0.00089 ^{ad}	1.41980 \pm 0.01355 ^d

a为 $P < 0.05$ 与空白对照组比较; b为 $P < 0.05$ 与 0.1 μ mol/L Ang^②组比较; c为 $P < 0.05$ 与 1 μ mol/L Ang^②组比较。d为 $P < 0.05$ 与 5 μ mol/L Ang^②组比较。

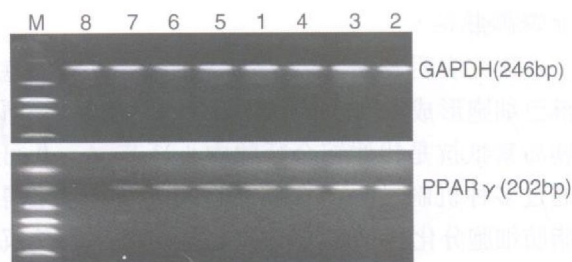


图 2. 不同浓度 Ang(1-7)和 Ang II 对 THP-1 细胞 PPAR γ mRNA 表达的影响 M 为 Marker,1 为空白对照组,2~4 分别为 10、1 和 0.1 μ mol/L Ang(1-7)组,5~8 分别为 0.1、1、5 和 10 μ mol/L Ang II 组。

Figure 2. Effect of Ang(1-7), AngII at different concentrations on PPAR γ mRNA expression in THP-1 macrophages

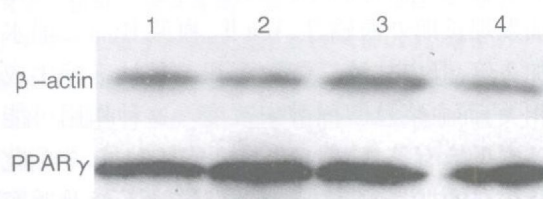


图 3. 不同浓度 Ang(1-7)对 THP-1 细胞 PPAR γ 蛋白表达的影响 1 为空白对照组,2~4 分别为 0.1、1、10 μ mol/L Ang(1-7)组。

Figure 3. Effect of Ang(1-7) at different concentrations on PPAR γ protein expression in THP-1 macrophages

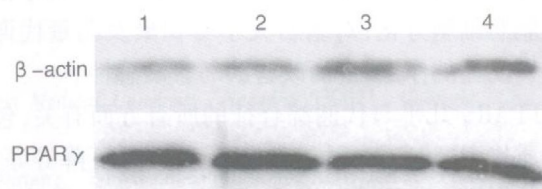


图 4. 不同浓度 Ang II 对 THP-1 细胞 PPAR γ 蛋白表达的影响 1~4 分别为 0.1、1、5、10 μ mol/L Ang II 组。

Figure 4. Effect of Ang II at different concentrations on PPAR γ protein expression in THP-1 macrophages

3 讨 论

以往研究表明,在动脉粥样硬化形成中, Ang^②可调节内皮细胞的凋亡、血管平滑肌细胞(VSMC)及成纤维细胞的增殖和迁移,促进泡沫细胞生成和血小板聚集、黏附。随着研究的深入,发现 Ang^②能通过刺激生长因子、细胞因子、趋化因子的产生来诱导强大的血管炎症反应,同时促进氧化型低密度脂蛋白摄取、产生氧自由基和影响纤溶功能等,在动脉粥样硬化形成中起重要作用^[9]。作为 RAS 系统的新成员, Ang(1-7)与 Ang^②的作用在很多方面相拮抗,包括促进尿钠排泄、抑制生长及心肌重塑,介导

血管扩张。

研究表明,注射的 AngⅡ通过载脂巨噬细胞和淋巴细胞形成新的损伤,从而促进动脉粥样硬化。胰岛素抵抗是代谢综合征的中心环节,AngⅡ可以通过多种机制导致胰岛素抵抗:AngⅡ可以阻碍前脂肪细胞分化,使更多的脂肪(甘油三酯)异位沉积于肝脏、骨骼肌、胰岛组织,由于脂毒性而导致胰岛素抵抗;阻断RAS后,脂肪细胞正常分化,形成小的对胰岛素敏感的脂肪细胞,减轻这些组织脂肪沉积,改善胰岛素抵抗;AngⅡ收缩血管,血流减少,使依赖胰岛素的组织如骨骼肌摄取葡萄糖量减少;胰岛素受体和受体后通路信号障碍等机制。在与脂质代谢有关的胰岛素抵抗机制中,Ran等^[10]使用标记的甘油发现长期外源输注 AngⅡ,血浆甘油三酯水平增加2倍,肝内甘油三酯的沉积与甘油三酯生成速率相关,而血浆总胆固醇未改变。这种作用可能与胰岛素抵抗有关,胰岛素抵抗下脂肪动员,非酯化游离脂肪酸增加,肝脏生成内源性甘油三酯及低密度脂蛋白增加;同时LPL功能受损,血浆向外周器官移除甘油三酯的能力下降,所以高甘油三酯血症是胰岛素抵抗的重要特征。Schupp等^[11]认为,ARB类药物都有调整脂肪大小的作用,而替米沙坦可能由于分子结构特殊,能激活PPAR γ ,促进PPAR γ 依赖的脂肪细胞分化,对脂肪大小与积聚及能量代谢有特别明显的作用,进而改善胰岛素敏感性。

PPAR γ 几乎与代谢综合征的所有方面有关,包括脂质代谢、胰岛素抵抗、高血压、糖耐量下降等等,在动脉粥样硬化形成的各个环节中,PPAR γ 抑制凝血酶诱导的内皮素1(ET-1)表达,后者是一种强烈的血管收缩多肽和平滑肌细胞增殖诱导物;PPAR γ 的激活物阻断单核细胞趋化因子10-kD蛋白(CFN- γ 诱导产生)及T细胞 α 化学趋化物(CFN- γ 诱导产生),还可以降低细胞因子诱导的血管细胞黏附分子1(VCAM-1)和细胞间黏附分子1(ICAM-1)的表达,对动脉粥样硬化早期病变发挥调理作用;PPAR α 、PPAR γ 和PPAR β/δ 的激活物可诱导ABCA1和SR-Biv的表达,从而促进巨噬细胞胆固醇的流出,对动脉粥样硬化斑块内脂质蓄积有调控作用;在局部炎症反应中,PPAR抑制细胞因子、基质金属蛋白酶、急性相反应物等炎症基因的表达,在各种免疫细胞和血管细胞,PPAR均显示出明显的抗炎作用。

综上所述,PPAR γ 为代谢综合征和动脉粥样硬化中的关键因子,AngⅡ对代谢综合征中的诸多方面如脂肪代谢、胰岛素抵抗、动脉粥样硬化形成均有

影响,其具体机制尚待明确。本研究以THP-1巨噬细胞为研究对象,证明AngⅡ呈浓度依赖性抑制细胞内PPAR γ 的表达,有助于我们理解AngⅡ影响代谢综合征发生的机制;同时ARB类药物替米沙坦可通过激活PPAR γ 的表达改善脂肪代谢,而本实验中Ang(1-7)呈浓度依赖性促进细胞内PPAR γ 的表达,启发我们进一步探讨Ang(1-7)对代谢综合征各方面的影响,为AngⅡ受体阻滞剂及Ang(1-7)受体激动剂的临床应用提供理论基础,进而以PPAR γ 为研究靶点,进一步探讨AngⅡ、Ang(1-7)对代谢综合征各方面的作用,深层次探讨其作用的分子机制。

[参考文献]

- [1] Guan Y, Breyer MD. Targeting peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in kidney and urologic disease [J]. *Minerva Urol Nefrol* 2002, 54: 65-79
- [2] Guan Y, Breyer MD. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): novel therapeutic targets in renal disease [J]. *Kidney Int* 2001, 60: 14-30
- [3] 杨光锐, 张志文, 管又飞. 脂质过氧化物增殖物激活受体研究概况 [J]. *生理科学进展*, 2003, 34: 329-332
- [4] Diep QN, Touyz RM, Schiffrin EL. Docosahexaenoic acid, a peroxisome proliferator-activated receptor- α ligand, induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase [J]. *Hypertension* 2000, 36: 851-855
- [5] 吴静, 张志文, 管又飞. LXR在脂质代谢中的作用 [J]. *生理科学进展*, 2004, 35: 69-72
- [6] 支建明. 血管紧张素1~7的研究进展 [J]. *山西医科大学学报*, 2001, 32(5): 467-469
- [7] 曾武涛, 董吁钢, 马虹, 等. 血管紧张素-(1-7)对血管紧张素Ⅱ诱导培养乳鼠非心肌细胞增殖的影响 [J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(4): 241-244
- [8] Freeman EJ, Chisolm GM, Ferrario CM, et al. Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth [J]. *Hypertension* 1996, 28(1): 104-108
- [9] Dzau VJ. Circulating versus local renin-angiotensin system in cardiovascular homeostasis [J]. *Circulation* 1988, 77(1): 14-13
- [10] Ran J, Hirano T, Adachi M. Chronic AngⅡ infusion increases plasma triglyceride level by stimulating hepatic triglyceride production in rats [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004, 287(5): E955-961
- [11] Schupp M, Janke J, Clasen R, et al. Angiotensin type 1 receptor blockers induce peroxisome proliferator-activated receptor- γ activity [J]. *Circulation* 2004, 109(17): 2054-057

(此文编辑 许雪梅)