

# 血管紧张素(1-7)阻断细胞外信号调节激酶 1/2、核因子 $\kappa$ B 信号通路影响泡沫细胞内胆固醇含量

刘娟, 杨志明, 边云飞, 闫丰

(山西医科大学第二医院心内科, 山西省太原市 030001)

[关键词] THP-1 源性泡沫细胞; 血管紧张素(1-7); 细胞外信号调节激酶 1/2; 核因子  $\kappa$ B

[摘要] **目的** 研究血管紧张素(1-7)对 THP-1 源性泡沫细胞中细胞外信号调节激酶 1/2 及核因子  $\kappa$ B 信号转导通路的影响,以进一步探讨血管紧张素(1-7)促进胆固醇逆转运的调节机制以及细胞外信号调节激酶 1/2 与核因子  $\kappa$ B 信号通路之间是否相互影响。**方法** 采用体外培养的 THP-1 单核细胞构建泡沫细胞模型,用不同的干预方法处理细胞 72 h,将细胞分为单核细胞(空白对照)组、泡沫细胞组、分别预先经  $10^{-6}$  mol/L 血管紧张素(1-7)、 $10 \mu\text{mol/L}$  核因子  $\kappa$ B 特异性阻断剂、 $10 \mu\text{mol/L}$  细胞外信号调节激酶 1/2 特异性阻断剂、 $10^{-6}$  mol/L 血管紧张素(1-7) +  $10 \mu\text{mol/L}$  核因子  $\kappa$ B 特异性阻断剂、 $10^{-6}$  mol/L 血管紧张素(1-7) +  $10 \mu\text{mol/L}$  细胞外信号调节激酶 1/2 特异性阻断剂干预的泡沫细胞组。油红 O 染色后显微镜下观察细胞形态;高效液相色谱法检测细胞内胆固醇含量的变化;免疫组化法检测细胞内核因子  $\kappa$ B(p65)活性的表达;免疫印迹法检测磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 蛋白的表达。**结果** 血管紧张素(1-7)显著降低了泡沫细胞内胆固醇的含量,下调了磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2、核因子  $\kappa$ B(p65)活性的表达( $P < 0.05$ ),细胞外信号调节激酶 1/2、核因子  $\kappa$ B 信号通路被特异性阻断后泡沫细胞内胆固醇含量降低( $P < 0.05$ );血管紧张素(1-7)联用细胞外信号调节激酶 1/2、核因子  $\kappa$ B 信号通路的特异性阻断剂后泡沫细胞内胆固醇含量显著降低( $P < 0.01$ );核因子  $\kappa$ B 信号通路被阻断后核因子  $\kappa$ B(p65)活性表达显著降低( $P < 0.01$ ),而磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 活性表达无明显降低( $P > 0.05$ ),细胞外信号调节激酶 1/2 信号通路被阻断后磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 和核因子  $\kappa$ B(p65)活性表达均降低( $P < 0.05$ )。**结论** 血管紧张素(1-7)可能通过降低磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2、核因子  $\kappa$ B(p65)的活性,减少细胞内胆固醇的蓄积;细胞外信号调节激酶 1/2、核因子  $\kappa$ B 信号通路被特异性阻断后可减少泡沫细胞内胆固醇的含量;细胞外信号调节激酶可能是核因子  $\kappa$ B(p65)信号通路的上游信号。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## An Effect on Cholesterol Content in Foam Cells by Blocking the Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 Signal Pathway and the Nuclear Factor- $\kappa$ B Signal Pathway with Angiotensin-(1-7)

LIU Juan, YANG Zhi-Ming, BIAN Yun-Fei, and YAN Feng

(Department of Cardiology, the Second Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] THP-1-derived Foam Cells; Angiotensin-(1-7); Extracellular Signal-regulated Kinase-1/2; Nuclear Factor- $\kappa$ B (p65)

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the regulation of angiotensin-(1-7) (Ang(1-7)) to the expression of the activity of extracellular signal-regulated kinase-1/2 (ERK1/2) and the activity of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in THP-1 derived-foam cells and to analyze the relationship between the ERK1/2 signal pathway and the NF- $\kappa$ B signal pathway. **Methods** To establish a macrophage-derived foam cell model of human monocytic THP-1 cell line, handle the cells in different conditions for 72 hours, which are divided into control group with medium added nothing, foam cell group, intervention fo-

[收稿日期] 2011-11-22

[基金项目] 山西省科学技术厅资助项目(20100311098-4)

[作者简介] 刘娟,硕士研究生,研究方向为冠心病的基础与临床,电话为 15834118821,E-mail 为 466844641@qq.com。通讯作者杨志明,硕士,教授,硕士研究生导师,研究方向为冠心病的基础与临床,电话为 13935153583,E-mail 为 Zhimingyang800@sina.com。边云飞,博士,副教授,硕士研究生导师,研究方向为冠心病的基础与临床。

am cell groups advanced respectively by  $10^{-6}$  mol/L Ang-(1-7), 10  $\mu$ mol/L PD98059, 10  $\mu$ mol/L TPCK (tosyl-phenylalanine chloromethyl-ketone),  $10^{-6}$  mol/L Ang-(1-7) + 10  $\mu$ mol/L TPCK,  $10^{-6}$  mol/L Ang-(1-7) + 10  $\mu$ mol/L PD98059. The differentiated cells were observed after oil red O staining under light microscope, high performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry (HPLC-MS) was used for quantitative analysis of cellular cholesterol, immunohistochemistry was employed to identify the expression of NF- $\kappa$ B in the differentiated cells, and the expression of p-ERK1/2 protection in the differentiated cells was detected by Western blotting. **Results** Ang-(1-7) downregulated the expression of the activity of ERK1/2 and the activity of NF- $\kappa$ B ( $P < 0.05$ ), meanwhile, Ang-(1-7) downregulated the content of cholesterol in THP-1 derived foam cells ( $P < 0.05$ ), specific inhibitor PD98059 and specific inhibitor TPCK was used to reduce the content of total cholesterol in THP-1 derived foam cells ( $P < 0.05$ ), compared with povidone Ang-(1-7) and specific inhibitor PD98059 or specific inhibitor TPCK was proved to significantly decrease the content of total cholesterol in THP-1 derived foam cells ( $P < 0.01$ ). Specific inhibitor TPCK was used to abrogate phosphorylation of NF- $\kappa$ B for further evaluation ( $P < 0.01$ ), but didnt abrogate phosphorylation of ERK1/2 for further evaluation ( $P > 0.05$ ). Specific inhibitor PD98059 was used to abrogate phosphorylation of ERK1/2 and NF- $\kappa$ B for further evaluation ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Ang-(1-7) can lessen the content of cholesterol in THP-1 derived foam cells by decreasing the the activity of ERK1/2 and the activity of NF- $\kappa$ B. Specific inhibitor PD98059 and specific inhibitor TPCK is used to reduce the content of total cholesterol in THP-1 derived foam cells. ERK1/2 may be the upstream substance before NF- $\kappa$ B in the signaling pathway.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)斑块形成是心脑血管疾病的共同病理基础,泡沫细胞的形成是早期关键性事件<sup>[1]</sup>。近年来在关于泡沫细胞的形成机制<sup>[2]</sup>方面做了大量的研究,其中以总胆固醇和胆固醇酯的蓄积为其主要机制之一。As 同时也是一个慢性炎症过程,核因子  $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)的活化在 As 斑块形成中发挥着重要作用<sup>[3]</sup>。Brand 等<sup>[4]</sup>发现 As 病灶粥瘤内膜、巨噬细胞、内皮细胞(endothelial cells, ECs)里均有活化 NF- $\kappa$ B。因此, NF- $\kappa$ B 在致动脉粥样硬化信号初始反应、进展中均扮演重要角色<sup>[3]</sup>。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPKs)家族是细胞内信号转导蛋白激酶,是细胞外信号与细胞核之间信息转导的重要通路。细胞外信号调节激酶 1/2(extracellular signal-regulated kinase-1/2, ERK1/2)、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun amino-terminal kinase, JNK)和 p38MAPK 是哺乳动物细胞中并行存在的 3 条主要的 MAPKs 信号转导通路<sup>[5, 6]</sup>。ERK1/2 信号转导途径被认为是经典的 MAPKs 信号转导途径。ERK1/2 在 As 发生发展尤其是在胆固醇平衡中起着调节作用,它能够明显减少巨噬/泡沫细胞胆固醇流向载脂蛋白 A I(apolipoprotein A I, Apo A I)。

血管紧张素(1-7)[angiotensin-(1-7), Ang(1-7)]是肾素-血管紧张素系统中具有广泛生物学活性的内源性血管紧张素,与特异性受体 Mas 结合通过相应信号转导通路发挥促胆固醇外流、抑制动脉粥样硬化的作用。通过我们前期的研究发现 Ang-

(1-7) 能致 THP-1 单核巨噬细胞过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$ <sup>[7]</sup>(peroxisome proliferator activated receptors  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )、三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ATP binding cassette transporter A1, ABCA1)表达增加,从而促进胆固醇逆转运过程,减少泡沫细胞的形成,减少 As 的发生发展。那么在 THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞中 ERK1/2、NF- $\kappa$ B 信号通路是否被激活? Ang(1-7)是否能够降低 p-ERK1/2 及 NF- $\kappa$ B(p65)的活性? 以及是否通过降低 p-ERK1/2 及 NF- $\kappa$ B 的活性来减少泡沫细胞内胆固醇的含量? 以及这两条信号通路之间的相互关系是怎样的? 于是我们设计了此项实验研究内容。

1 材料与方法

1.1 仪器和材料

THP-1 单核细胞株购于中国科学院上海细胞库, RPMI 1640 细胞培养基购于 Hyclone 公司,胎牛血清购于杭州四季青公司,佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)、Ang(1-7)、PD98059、甲基磺酰苯丙氨酰氯甲酮(tosyl-phenylalanine chloromethyl-ketone, TPCK)均购于 Sigma 公司, NF- $\kappa$ B(p65)一抗购于 Bioworld Technology 公司, p-ERK1/2 一抗、ABCA1 一抗均购于 Santa Craye 公司,胆固醇标准品购于中国药品生物制品检定所,逆转录-聚合酶链反应试剂盒购自大连 TaKaRa 公司,氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)购于北京欣和佳源公司,油红 O 试剂购于北京索莱宝公司,异丙

醇、乙腈为天津市河东区红岩试剂厂产品。 $\text{CO}_2$  培养箱系美国 Thermo 公司产品,高效液相色谱仪为美国 Waters 公司产品。

## 1.2 细胞培养

将 THP-1 单核细胞置于含 15% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱静置培养,培养液中加入青霉素、链霉素各  $1.0 \times 10^5 \text{ U/L}$ 。该细胞株属人类单核细胞系,在培养液中呈簇集状悬浮生长,倍增时间大约在 26 h 后。细胞浓度控制在  $10^9$  个/L,每 2 天换液 1 次,每 4 天传代 1 次。

## 1.3 THP-1 源性泡沫细胞模型的制备及实验分组

参照文献方法制备 THP-1 源性泡沫细胞模型<sup>[8]</sup>。THP-1 单核细胞置于含 15% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱常规静置培养。取第 3~6 代的细胞用于造模,在每次实验前用 160 nmol/L PMA 孵育 THP-1 细胞 24 h,使其诱导分化成巨噬细胞,弃培养液,换新 RPMI 1640 培养液并加入 50 mg/L 的 ox-LDL,静置培养 48 h 诱导其分化为泡沫细胞。实验共分 7 组:单核细胞组(空白对照组);RPMI 1640 培养液培养 72 h;泡沫细胞组:160 nmol/L PMA 孵育 24 h 诱导成巨噬细胞后,加入 50 mg/L 的 ox-LDL,静置培养 48 h 诱导分化为泡沫细胞;Ang(1-7)组:160 nmol/L PMA 孵育 24 h 后,Ang(1-7)预先孵育 1 h 后加入 50 mg/L 的 ox-LDL 静置培养 47 h;TPCK(NF- $\kappa\text{B}$  特异性阻断剂)组:160 nmol/L PMA 孵育 24 h 后,TPCK 预先孵育 30 min 后,加入 50 mg/L 的 ox-LDL 静置培养 47.5 h;PD98059(ERK1/2 特异性阻断剂)组:160 nmol/L PMA 孵育 24 h 后,PD98059 预先孵育 30 min 后加入 50 mg/L 的 ox-LDL,静置培养 47.5 h;TPCK + Ang(1-7)组:160 nmol/L PMA 孵育 24 h 后,TPCK 预先孵育 30 min 后,加入 Ang(1-7)孵育 1 h 后加入 50 mg/L 的 ox-LDL 静置培养 46.5 h;PD98059 + Ang(1-7)组:160 nmol/L PMA 孵育 24 h 后,PD98059 预先孵育 30 min,加入 Ang(1-7)孵育 1 h 后再加入 50 mg/L 的 ox-LDL 静置培养 46.5 h。

## 1.4 泡沫细胞模型鉴定

采用 Lillie 氏油红 O 染色法。将 THP-1 单核细胞接种于 6 孔板中,按上述方法培养泡沫细胞模型,诱导建模结束后,吸去上清液。用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)洗 3 次,加 10% 甲醛固定 15 min, PBS 洗 3 次,经 60% 异丙醇漂洗 1 次(20~30 s)。稀释油红 O 储存液,油红:去离子水=3:2,滤纸过滤 4~5 次,室温放置 10 min,染色

15 min 左右,经 60% 异丙醇分化数秒钟,水洗 1~2 min,用稀释 1 倍的明矾苏木素染液淡染细胞核 30 s,水洗返蓝。显微镜下观察并摄像。

## 1.5 高效液相色谱仪检测细胞内胆固醇的含量

采用文献报道的方法<sup>[8]</sup>,样品处理结束后吸去上清液, PBS 洗 3 次,用细胞刮刀刮取细胞,置于离心管中,冰浴中超声破碎 10 min,得细胞裂解液,均分 2 份,用于提取总胆固醇和游离胆固醇。总胆固醇的提取:取 160  $\mu\text{L}$  上述细胞裂解液,加 300  $\mu\text{L}$  15% KOH-乙醇溶液,  $50^\circ\text{C}$  水解 2 h,加正己烷-异丙醇(4:1)500  $\mu\text{L}$ ,涡旋 30 s,  $4^\circ\text{C}$  下 3 600 r/min 离心 5 min,取上层,继用正己烷-异丙醇(4:1)如上法抽提 2 次,合并 3 次抽提的有机相,液氮吹干干燥,用流动相溶液(异丙醇:乙腈=50:50)定容至 100  $\mu\text{L}$ ,摇匀,作为总胆固醇标准品的供试液;游离胆固醇的提取:取 160  $\mu\text{L}$  上述细胞裂解液,加 300  $\mu\text{L}$  乙醇,加正己烷-异丙醇(4:1)500  $\mu\text{L}$ ,涡旋 30 s,  $4^\circ\text{C}$  下 3 600 r/min 离心 5 min,取上层,继用正己烷-异丙醇(4:1)如上法抽提 2 次,合并 3 次抽提的有机相,液氮吹干干燥,用流动相溶液定容至 100  $\mu\text{L}$ ,摇匀,作为游离胆固醇标准品的供试液。取胆固醇标准品适量溶解于流动相中,置于 10 mL 玻璃瓶中,等倍比稀释 5 个不同的浓度于 EP 管中,分别是 0、78.125、156.25、312.5、625、1 250 mg/L,将上述标准品溶液分别注入高效液相色谱仪,进样量为 10  $\mu\text{L}$ ,以胆固醇的质量浓度为横坐标 X 轴,其峰面积为纵坐标 Y 轴,绘制标准曲线。采用 Waters 反向 C18 柱,流动相为异丙醇-乙腈(50:50),流速为 1 mL/min,柱温为  $40^\circ\text{C}$ ,将各实验组所得的样品溶液(实验重复 3 次)按上述色谱条件,进样 20  $\mu\text{L}$ ,记录胆固醇的峰面积,代入回归方程,计算总胆固醇量和游离胆固醇量。总胆固醇量减去游离胆固醇量为胆固醇酯的量。

## 1.6 免疫组织化学法检测核因子 $\kappa\text{B}$ (p65) 活性

将 24 孔板的盖玻片经过水洗、泡酸、蒸馏水洗、高压灭菌后置于 24 孔板内,样品处理结束后,弃培养液, PBS 漂洗 2 次,每次 2 min, 95% 酒精室温固定 15 min, PBS 漂洗 3 次,每次 2 min, 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理(室温)15 min, PBS 漂洗 3 次,每次 2 min,滴加含 5% 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)血清封闭液,  $37^\circ\text{C}$  放置 20 min,取出甩干封闭液(不漂洗),加一抗(1:100)(PBS 稀释)  $37^\circ\text{C}$  2 h, PBS 漂洗 3 次,每次 2 min,二抗(生物素化羊抗兔)孵育  $37^\circ\text{C}$  20 min, PBS 漂洗 2 次,每次 2 min, SABC 孵育湿盒内  $37^\circ\text{C}$  20 min, PBS 漂洗 2 次,每次 2 min, DAB 显色 5 min,蒸馏水洗,苏木素复染 30 s,自来水洗, 70%、80%、85%、90% 无水乙醇依次漂洗,树胶封片



并显微镜下观察。

1.7 免疫印迹法检测细胞外信号调节激酶 1/2 蛋白的表达

细胞蛋白质的提取:收集细胞,弃去上清。在细胞沉淀中加入细胞裂解液,用 1 mL 的小注射器反复抽吸细胞,使细胞完全碎裂。在其中加入等体积的样品缓冲液混匀,95℃ 5 min,使蛋白质变性,离心(10 000 r/min, 5 min)后取上清置于 EP 管,等量分装,-20℃ 冰箱保存。蛋白质免疫印迹分析法:配置 12% 分离胶、5% 积层胶,按说明组装电泳装置,配胶灌胶,两块胶配好之后,从电泳装置上卸下玻璃板,撬开玻璃板,取出凝胶,准备转膜;转膜:剪下与凝胶大小相同的 1 张 PVDF 膜和 6 张 Whatmann 滤纸,湿转移仪中按下列顺序依次放置:(阳极)3 张 Whatmann 滤纸,PVDF 膜,3 张 Whatmann 滤纸(阴极),PVDF 膜的正面与凝胶紧贴。接通电源,以 2 mA/cm<sup>2</sup> 的电流转移 2.5 h,转膜结束后关闭电源;封闭:从湿转移仪中取出 PVDF 膜,用 TBST(tris-buffered saline and tween 20)溶液漂洗 3 次,每次 5 min。将 PVDF 膜放入塑料袋中以 0.1 mL/cm<sup>2</sup> 加入

封闭液,4℃ 封闭过夜;结合一抗:取出 PVDF 膜,用 TBST 溶液漂洗 3 次,每次 5 min。将 PVDF 膜放入塑料袋中以 0.1 mL/cm<sup>2</sup> 加入一抗(1:1 000 溶于 TBST 中)4℃ 孵育过夜;与上述方法类似结合二抗(1:1 000 溶于 TBST 中);显影:显影后扫描图像进行统计学分析。

1.8 统计学处理

实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,使用 SPSS 13.0 统计软件对实验数据进行单因素方差分析,多重比较采用 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

将 THP-1 单核细胞(图 1A)用 PMA 诱导 24 h 后可见细胞呈梭形贴壁生长,多数细胞伸出伪足,说明细胞已分化为巨噬细胞(图 1B),再用 50 mg/L ox-LDL 与巨噬细胞共同孵育 48 h 后,经油红 O 染色,显微镜下观察,细胞质内有大量的红色脂质颗粒存在,符合泡沫细胞形态特点(图 1C)。

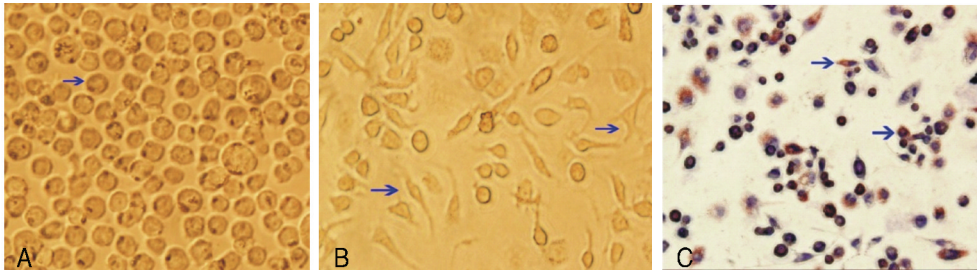


图 1. THP-1 细胞的转化(40 × 10) A 为 THP-1 单核细胞,B 为巨噬细胞,C 为泡沫细胞;蓝色箭头所指为具有代表性的单核细胞、巨噬细胞、泡沫细胞。

Figure 1. Transformation of THP-1 macrophages (40 × 10)

2.2 血管紧张素(1-7)、TPCK、PD98059 对细胞内胆固醇含量的影响

与空白对照组相比,泡沫细胞及各干预组细胞内总胆固醇含量明显增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与泡沫细胞相比,经 Ang(1-7)、TPCK、PD98059 干预的泡沫细胞中总胆固醇含量明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与 Ang(1-7)干预的泡沫细胞相比,TPCK、PD98059 干预的泡沫细胞中总胆固醇含量无明显变化,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而 Ang(1-7) + TPCK、Ang(1-7) + PD98059 干预的泡沫细胞中总胆固醇含量显著下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ;图 2 和表 1)。

表 1. 不同干预对 THP-1 细胞内胆固醇含量的影响( $n = 3$ )  
Table 1. The impact of different intervention on THP-1 macrophages cholesterol content ( $n = 3$ )

分 组	总胆固醇(mg/L)	游离胆固醇(mg/L)
空白对照组	17.433 ± 0.729	10.467 ± 0.785
泡沫细胞组	38.583 ± 0.617 <sup>a</sup>	16.350 ± 0.700 <sup>a</sup>
Ang(1-7)组	25.600 ± 0.436 <sup>ab</sup>	12.250 ± 0.050 <sup>ab</sup>
TPCK 组	28.630 ± 1.121 <sup>ab</sup>	14.313 ± 1.017 <sup>ab</sup>
PD98059 组	28.353 ± 1.703 <sup>ab</sup>	14.220 ± 1.215 <sup>ab</sup>
Ang(1-7) + PD98059 组	19.100 ± 1.758 <sup>ac</sup>	10.713 ± 0.397 <sup>ac</sup>
Ang(1-7) + TPCK 组	21.120 ± 1.040 <sup>ac</sup>	10.737 ± 0.741 <sup>ac</sup>

a 为  $P < 0.05$ ,与空白对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与泡沫细胞组比较;c 为  $P < 0.05$ ,与 Ang(1-7)组比较。

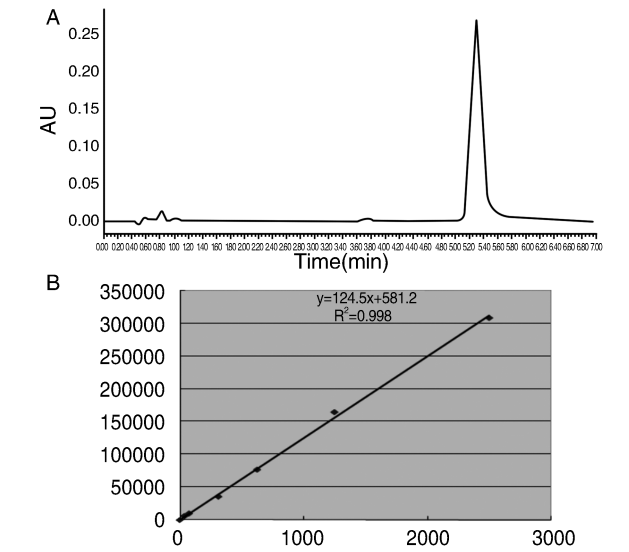


图 2. 胆固醇标准品出峰时间和标准曲线 A 为胆固醇标准品出峰时间, B 为胆固醇标准品标准曲线。

Figure 2. Cholesterol standard peak time and the standard curve

### 2.3 核因子 $\kappa\text{B}$ (p65 亚基) 活性测定

THP-1 单核细胞经 PMA、ox-LDL 诱导形成泡沫细胞后 NF- $\kappa\text{B}$  高度活化, 与空白对照组比较, 泡沫

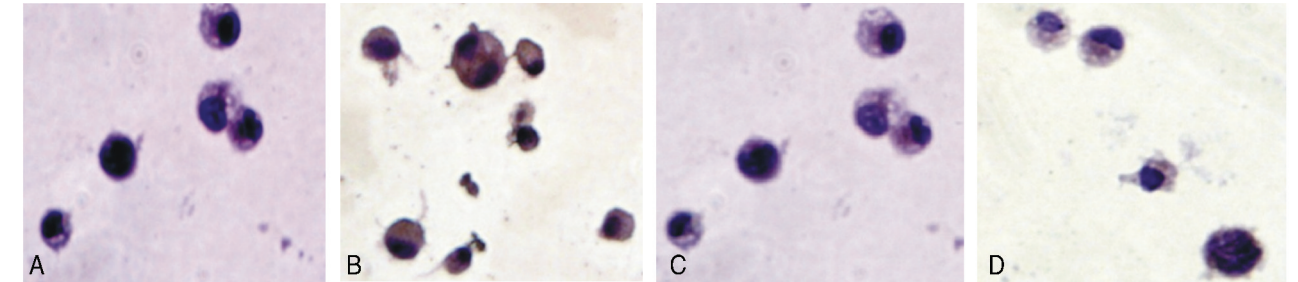


图 3. 不同干预对 THP-1 细胞 NF- $\kappa\text{B}$  (p65) 活性的影响 (40  $\times$  10) A 为空白对照组, B 为泡沫细胞组, C 为 Ang(1-7) 组, D 为 PD98059 组。蓝色代表细胞核, 棕色代表胞浆和(或)胞核 NF- $\kappa\text{B}$  (p65) 活性的表达。

Figure 3. Effect of different intervention on NF- $\kappa\text{B}$  (p65) activity in THP-1 macrophages (40  $\times$  10)

## 3 讨论

动脉粥样硬化进展过程中伴随着胆固醇的大量蓄积和广泛炎症因子的产生, 后者进一步促进 As 进展。Ferreira 等研究证实通过过度表达 I $\kappa$ B $\alpha$ , 特异性抑制巨噬细胞内 NF- $\kappa\text{B}$  活化可降低巨噬细胞脂质流入, 转录因子 PPAR $\gamma$ 、肝 X 受体  $\alpha$  (liver X receptor alpha, LXR $\alpha$ )、胆固醇流出主要转运子 ABCA1、脂质摄入受体 CD36 的增加, 其净效应是减少了泡沫细胞形成, 说明 NF- $\kappa\text{B}$  可能参与了 ABCA1 的转录调控。我们的实验研究显示, THP-1 单核细胞经 PMA、ox-LDL 诱导形成泡沫细胞后, NF- $\kappa\text{B}$  (p-

细胞中 NF- $\kappa\text{B}$  在胞浆及胞核中均有显著表达 ( $P < 0.01$ ); 与泡沫细胞相比, 经 Ang(1-7)、PD98059 干预的泡沫细胞中 NF- $\kappa\text{B}$  在胞浆及胞核中表达降低 ( $P < 0.05$ ; 图 3)。

### 2.4 细胞内磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 蛋白的表达

2.4.1 单核细胞、泡沫细胞、血管紧张素(1-7)干预的泡沫细胞磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 蛋白表达 与空白对照组比较, 泡沫细胞及 Ang(1-7) 干预的泡沫细胞 p-ERK1/2 蛋白表达显著增加, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 与泡沫细胞相比, 经 Ang(1-7) 干预的泡沫细胞中 p-ERK1/2 蛋白降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。

2.4.2 泡沫细胞与 TPCK、PD98059 等各干预组磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 蛋白表达变化 与泡沫细胞组相比, p-ERK1/2 蛋白在 TPCK 组无明显变化 ( $P > 0.05$ ), 在 PD98059 组、Ang(1-7) + PD98059 组、Ang(1-7) + TPCK 组中表达降低 ( $P < 0.05$ ); 与 PD98059 组相比, Ang(1-7) + PD98059 组中 p-ERK1/2 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.01$ ; 图 5)。

65) 在胞浆、胞核中的活性表达显著增加, 胆固醇含量明显增加, 而单核细胞(空白对照)组只在胞浆中 NF- $\kappa\text{B}$  (p65) 有少量的表达, 胆固醇含量极少, 经 Ang(1-7)、ERK1/2 特异性阻断剂 (PD98059) 干预的泡沫细胞中 NF- $\kappa\text{B}$  (p65) 主要在胞浆中有表达, 胞核中有少量表达, 胆固醇含量较少, 其机制可能是 PMA、ox-LDL 诱导形成的泡沫细胞激活 NF- $\kappa\text{B}$  (p65) 在胞浆中的表达, 继而 NF- $\kappa\text{B}$  被释放并迅速移位入细胞核 (nuclear translocation, 核易位)。活化的 NF- $\kappa\text{B}$  在核内与相关靶基因启动子区域的  $\kappa\text{B}$  位点特异性结合, 启动靶基因的转录, 从而导致泡沫细胞表面 ABCA1 的表达降低, 胆固醇外流减少而

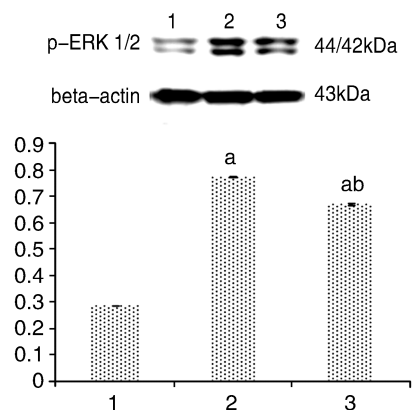


图4. 单核细胞、泡沫细胞、Ang(1-7)干预的泡沫细胞内 p-ERK1/2 蛋白表达的变化 1 为单核细胞(空白对照)组,2 为泡沫细胞组,3 为 Ang(1-7)干预的泡沫细胞组。a 为  $P < 0.01$ ,与空白对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,与泡沫细胞组比较。

Figure 4. Changes of p-ERK1/2 protein expression in THP-1 cells by monocytes, foam cells, Ang(1-7) intervention

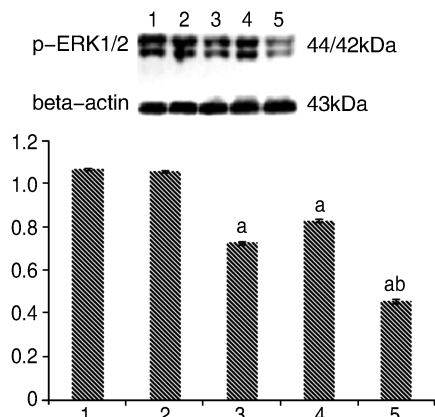


图5. 不同干预组对泡沫细胞 p-ERK1/2 蛋白表达的影响 1 为泡沫细胞组,2 为 TPCK 组,3 为 PD98059 组,4 为 Ang(1-7) + TPCK 组,5 为 Ang(1-7) + PD98059 组。a 为  $P < 0.05$ ,与泡沫细胞组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与 PD98059 组比较。

Figure 5. Effect of different intervention on p-ERK1/2 protein expression in foam cell

造成了泡沫细胞内胆固醇的蓄积。经 Ang(1-7)、PD98059 干预后抑制了 NF- $\kappa$ B(p65)在泡沫细胞的核易位,降低了它在胞核的表达,从而减少了由活化的 NF- $\kappa$ B(p65)引起的胆固醇蓄积,进一步降低了 As 的发生。

细胞外信号调节激酶 1/2 信号转导途径被认为是 MAPKs 经典的信号转导途径,近年研究发现 ERK1/2 与氧化应激信号转导通路也有关系<sup>[9-13]</sup>。而氧化应激学说是动脉粥样硬化斑块形成学说中的重要组成部分。进一步的研究发现,氧化应激在动脉粥样硬化的早期能促进泡沫细胞的形成<sup>[14,15]</sup>。

我们的实验研究发现,THP-1 单核细胞经 PMA、ox-LDL 诱导形成泡沫细胞后,p-ERK1/2 在胞浆表达显著增强,胆固醇含量显著增加;单核细胞(空白对照)组 p-ERK1/2 在胞浆中几乎无表达,胆固醇含量极少;预先经 Ang(1-7)、PD98059 干预的泡沫细胞,胞浆中 p-ERK1/2 的表达较泡沫细胞降低,胆固醇含量减少;而预先经 NF- $\kappa$ B 特异性阻断剂(TPCK)干预的泡沫细胞,胞浆中 p-ERK1/2 的表达较泡沫细胞无明显变化,胆固醇含量降低。说明泡沫细胞能使 ERK1/2 磷酸化并使它活性增强,胆固醇含量增加,预先经 TPCK 干预的泡沫细胞内 p-ERK1/2 的活性无明显变化,Ang(1-7)、PD98059 能够部分抑制 p-ERK1/2 在胞浆中的表达,从而降低了 p-ERK1/2 的活性,减少了泡沫细胞内胆固醇的含量。

血管紧张素(1-7)与特异性受体 Mas 结合,通过相应信号转导通路发挥促胆固醇外流、抑制动脉粥样硬化的作用。我们前期的研究发现,Ang(1-7)能致 THP-1 单核巨噬细胞 PPAR $\gamma$ 、ABCA1 表达增加,从而促进胆固醇逆转运过程,减少泡沫细胞的形成。我们的实验结果显示:在泡沫细胞组中胆固醇含量明显增高,经 Ang(1-7)、TPCK、PD98059 预先干预的泡沫细胞中胆固醇含量降低,若 Ang(1-7)同时联用 TPCK 或 PD98059 后胆固醇含量会显著降低,考虑其机制可能是 Ang(1-7)通过抑制 NF- $\kappa$ B(p65)、p-ERK1/2 在胞核和(或)胞浆的活性,减少了泡沫细胞内胆固醇的含量。那么 Ang(1-7)抑制 NF- $\kappa$ B(p65)、p-ERK1/2 的活性是否通过增加 ABCA1、PPAR $\gamma$  的表达来减少泡沫细胞内胆固醇的含量呢? TPCK 或 PD98059 信号通路被特异性阻断后如何减少泡沫细胞内胆固醇含量呢? 这些问题尚有待我们进一步的研究。本次研究的目的是基于 Ang(1-7)在防治 As 中的抗炎、抗增殖机制,进一步完善 Ang(1-7)减少泡沫细胞形成、延缓动脉粥样斑块形成的机制方面所起的作用,从而阐明 Ang(1-7)在 As 的发生发展中所起的保护作用,为 Ang(1-7)的临床应用前景打下基础。

[参考文献]

[1] Libby P. Inflammation in atherosclerosis[J]. Nature, 2002, 420(6917): 868-874.  
[2] 杨永宗. 中国动脉粥样硬化病理生理学研究近况[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(4): 481-489.  
[3] Liyama K, Hajra L, Iiyama M, et al. Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic le-



- sions and at sites predisposed to lesion formation[J]. *Circ Res*, 1999, 85(2): 199-207.
- [4] Brand K, Page S, Rogler G, et al. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion[J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(7): 1 715-722.
- [5] Muslin AJ. MAPK signaling in cardiovascular health and disease : molecular mechanisms and therapeutic targets [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2008, 115(07): 203-218.
- [6] Rzuicldo EM. Signaling pathways regulating vascular smooth muscle cell differentiation[J]. *Vascular*, 2009, 17(01): S15-S20.
- [7] 亢小红, 杨志明, 边云飞, 等. 不同浓度的血管紧张素 II、血管紧张素-(1-7)对 THP-1 巨噬细胞过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(6): 505-509.
- [8] 王术玲, 潘华新, 王培训. THP-1 巨噬细胞源性泡沫细胞模型的建立及鉴定[J]. *中药新药与临床药理*, 2009, 20(3): 281-285.
- [9] Laia Caja, Patricia Sancho, Esther Bertran, et al. Overactivation of the MEK/ERK pathway in liver tumor cells confers resistance to TGF-beta-induced cell death through impairing up-regulation of the NADPH oxidase NOX4[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(19): 7 595-602.
- [10] Papaiahgari S, Kleeberger SR, Cho HY, et al. NADPH oxidase and ERK signaling regulates hyperoxia-induced Nrf2-ARE transcriptional response in pulmonary epithelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(40): 42 302-312.
- [11] Faridis Serrano, Angela Chang, Caterina Hernandez, et al. NADPH oxidase mediates beta-amyloid peptide-induced activation of ERK in hippocampal organotypic cultures[J]. *Mol Brain*, 2009, 2(1): 391-397.
- [12] Susa S, Wakabayashi I. Extracellular alkalosis activates ERK mitogen-activated protein kinase of vascular smooth muscle cells through NADPH-mediated formation of reactive oxygen species[J]. *FEBS Letters*, 2003, 554(3): 399-402.
- [13] Junichi Yatabe, Hironobu Sanada, Midori Sasaki Yatabe, et al. Angiotensin II type 1 receptor blocker attenuates the activation of ERK and NADPH oxidase by mechanical strain in mesangial cells in the absence of angiotensin II [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 296(5): F1 052-060.
- [14] Draude GN, Hrbotick Y, Lorenz RL. The expression of the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) on human vascular smooth muscle cells and monocytes and its down-regulation by lovastatin[J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, 57(4): 383-386.
- [15] Morawietz H. LOX-1 and atherosclerosis: proof of concept in LOX-1-knockout mice [J]. *Circ Res*, 2007, 100(11): 1 534-536.
- (此文编辑 曾学清)