

血管紧张素(1-7)通过 Dll4/TLR-4/NF- κ B 通路减轻巨噬细胞的炎症反应

陈伟燕, 谢富华, 温艺超, 张瑞昌, 陈洁茹

(广州医科大学附属第二医院重症医学科, 广东省广州市 510260)

[关键词] 血管紧张素(1-7); Notch 信号通路; 巨噬细胞; Toll 样受体 4/核因子 κ B 通路

[摘要] 目的 探讨 Notch 信号通路在血管紧张素(1-7) [Ang-(1-7)] 调控动脉粥样硬化(As) 炎症反应中的作用。方法 诱导人单核细胞白血病细胞株分化为巨噬细胞, 然后随机分为对照组、氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL) 组、Ang-(1-7) 组和 Ang-(1-7)+A-779 组, 以相应药物处理后用 ox-LDL 刺激建立泡沫细胞模型。利用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 Ang-(1-7) 对泡沫细胞分化过程中 Notch 信号通路分子的影响, 包括 Notch 受体(Notch1、Notch2、Notch3、Notch4)、Notch 配体(Dll1、Dll3、Dll4、Jagged1、Jagged2) 和目标基因 Hes1, ELISA 法检测炎症因子白细胞介素 1 β (IL-1 β)、IL-6 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的表达。进一步用可溶性 Dll4(Dll4. Fc) 激活 Notch 信号通路, 用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 Hes1 和 Toll 样受体 4(TLR-4)/核因子 κ B(NF- κ B) 通路的变化进一步验证 Ang-(1-7) 对 Dll4 通路的影响。结果 给予 Ang-(1-7) 处理后, 由 ox-LDL 刺激巨噬细胞产生的炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 被显著抑制($P < 0.05$)。同时, 在泡沫细胞中 Notch 信号通路各分子的表达发生了不同的变化。其中 Notch 信号通路下游靶基因 Hes1 mRNA 的表达量经 ox-LDL 刺激后均明显增加, Ang-(1-7) 可部分抑制 Hes1 的激活, Ang-(1-7) 受体拮抗剂 A-779 可逆转 Ang-(1-7) 的作用。Notch1、Notch2 受体及 Dll1 配体的 mRNA 表达量在 ox-LDL 组明显下调, 而 Ang-(1-7) 组明显上调($P < 0.05$)。而 Notch3、Notch4 受体及 Jagged2、Dll4 配体的 mRNA 表达量在 ox-LDL 组明显增加($P < 0.05$), 给予 Ang-(1-7) 干预后, 其表达量较 ox-LDL 组明显下降($P < 0.05$)。Dll3 和 Jagged1 配体在各组间表达量无明显变化($P > 0.05$)。Western blot 也可见 ox-LDL 刺激诱导 Notch3、Notch4、Dll4 和 Hes1 蛋白明显升高($P < 0.05$), Ang-(1-7) 可明显下调其表达($P < 0.05$), 而 A-779 能部分抑制 Ang-(1-7) 的作用($P < 0.05$)。利用 Dll4. Fc 激活 Notch 信号通路可见炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 表达显著增加($P < 0.05$), Hes1、TLR-4 mRNA 和蛋白, 以及 iNOS mRNA 的表达增高($P < 0.05$), 并促进 NF- κ B 核转位, Ang-(1-7) 能明显下调其表达, A-779 能部分逆转 Ang-(1-7) 的作用, 差异有统计学差异($P < 0.05$)。结论 Ang-(1-7) 可能通过调节 Dll4 相关通路, 从而减轻 TLR-4/NF- κ B 通路激活所致的巨噬细胞炎症因子分泌的作用。

[中图分类号] R363;R5

[文献标识码] A

Angiotensin-(1-7) may alleviate inflammatory effects of macrophages through Dll4/TLR-4/NF- κ B pathway

CHEN Weiyan, XIE Fuhua, WEN Yichao, ZHANG Ruichang, CHEN Jieru

(Intensive Care Unit, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510260, China)

[KEY WORDS] angiotensin-(1-7); Notch signaling pathway; macrophage; toll like receptor-4/nuclear factor kappaB signaling pathway

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of Notch pathway in the anti-atherosclerotic effect of angiotensin-(1-7) (Ang-(1-7)). **Methods** Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) was used to induce macrophages to foam cells.

At first, 10^{-7} mmol/L Ang-(1-7) and 10^{-5} mmol/L A-779 were pre-cultured with macrophages before ox-LDL administered

[收稿日期] 2019-06-05

[修回日期] 2019-10-23

[基金项目] 广东省科技计划项目(2017ZC0245);广州市属高校科技项目(1201431050)

[作者简介] 陈伟燕, 博士研究生, 主治医师, 主要研究方向为心血管重症的诊治, E-mail 为 sam11124@163.com。通信作者 陈洁茹, 硕士, 副主任医师, 研究方向为急危重症疾病的诊治, 对血栓栓塞性疾病和凝血功能异常有深入研究, E-mail 为 yanniskyyx@126.com。

solely or together in Ang-(1-7) group and A-779 group. Notch ligands, receptors and downstream product Hes1 were assayed by qRT-PCR and Western blot. Second, delta-like (Dll) 4. Fc was co-cultured with macrophages to activate Notch pathway, toll like receptor-4 (TLR-4), nuclear factor kappaB (NF- κ B) and iNOS mRNA and protein were assayed by qRT-PCR and Western blot, proinflammatory cytokines interleukin 1beta (IL-1 β), IL-6 and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) were assayed by using ELISA. **Results** Notch1, Notch2 and Dll1 mRNA levels were significantly decreased in ox-LDL group, whereas elevated in Ang-(1-7) group ($P < 0.05$). Meanwhile, Notch3, Notch4, Dll4 and Jagged2 mRNA levels were significantly increased in ox-LDL group, while reduced in Ang-(1-7) group ($P < 0.05$). There was no difference in Dll3 and Jagged1 mRNA levels between ox-LDL group and Ang-(1-7) group ($P > 0.05$). The downstream product of Notch pathway gene Hes1 was significantly activated by ox-LDL ($P < 0.05$), while decreased by Ang-(1-7) administrated ($P < 0.05$). Using Dll4. Fc to activate Notch pathway could increase the expressive levels of Hes1 and TLR-4, promote translocation of NF- κ B from cytoplasm to nucleus, and stimulate inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α secretion ($P < 0.05$). Ang-(1-7) could rescue this alternation significantly ($P < 0.05$). Co-treatment with A-779 can reverse the effect partially ($P < 0.05$). **Conclusion** Ang-(1-7) could alleviate TLR-4/NF- κ B-induced inflammatory cytokines secretion in macrophages via regulating Dll4-associated pathway.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是心、脑血管疾病的共同病理基础^[1-2], 但 As 的发病机制至今尚未完全明了。近年来研究提示, As 是一个非特异性慢性炎症反应过程。动脉壁对各种炎症损伤产生炎症增殖反应, 这一反应以保护性反应开始, 在过度时则发展为斑块, 而其中内膜巨噬细胞聚集, 泡沫细胞形成是 As 最主要的病理特征^[3]。血管紧张素(1-7) [angiotensin-(1-7), Ang-(1-7)] 是肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 中的新成员, 它与血管紧张素 II (Ang II) 有相拮抗的作用, 主要表现在舒张血管、调节血压、抗细胞增殖等方面, 对心血管系统具有多方面的调节和保护作用^[4-7]。既往研究表明, Ang-(1-7) 可抑制巨噬细胞浸润和炎症因子释放, 具有减轻 As 炎症反应的作用^[8]。但具体机制暂不明确。

Notch 信号通路具有调控细胞增殖、分化和凋亡的作用, 是一高度保守的信号通路^[9-10]。在哺乳动物中, Notch 受体由 4 个不同的基因编码, 即 Notch1、2、3、4; Notch 配体由 5 个不同的基因编码, 分别为 Jagged1、2 和 Dll1、3、4; 细胞内的转录因子包括 Hes1 等^[11]。其中 Hes1 是 Notch 通路的下游靶分子, 反映 Notch 信号通路的激活情况。2007 年 Fung 等^[12]发现, Notch 信号通路在巨噬细胞介导的炎症应答和动脉粥样斑块中高表达, 认为 Notch 信号通路具有促进炎症和 As 的作用。Hans 等^[13]证实在 Ang II 诱导的 ApoE 小鼠腹主动脉瘤模型和人腹主动脉瘤中 Notch1 信号活化, Notch 半敲除能明显降低 Ang II 诱导的 ApoE 小鼠腹主动脉瘤的发生率。Ang-(1-7) 具有与 Ang II 相拮抗的作用, 其减轻 As 的作用是否与调节 Notch 信号通路表达有关目前尚不明确。

本研究通过氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, ox-LDL) 诱导人源巨噬细胞荷脂为泡沫细胞, 探讨 Ang-(1-7) 对泡沫细胞形成过程中 Notch 信号通路的影响, 了解 Ang-(1-7) 调控 As 炎症反应的作用是否与 Notch 信号通路有关。

1 材料和方法

1.1 THP-1 细胞株

THP-1 细胞株购自中科院上海细胞库, 来源于美国模式培养物集存库。

1.2 主要试剂和仪器

Ang-(1-7) 和 Ang-(1-7) 特异性受体抑制剂 A-779 购自美国 Bachem 公司; PMA 购自美国 Sigma 公司; ox-LDL 购自广州晶欣生物科技有限公司; DMEM 培养基、RPMI-1640 培养基、胎牛血清购自美国 Hyclone 公司; DMEM/F12 培养基购自 GIBCO 公司; TRIzol[®] Reagent 购自 Life Technologies 公司; Genesee[®] II First Stand cDNA Synthesis Kit 和 Genesee[®] qPCR SYBR[®] Green Master Mix 购自广州吉赛生物科技有限公司; Nucleic Acid Stain 核酸染料购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; NormalRun[™] 250bp-II DNA Ladder 购自上海捷瑞生物工程有限公司; ELISA 试剂盒购自美国 ExCell Biology 公司; K2800 核酸分析仪购自北京凯奥科技发展有限公司; 电泳仪购自北京君意电泳设备有限公司; 全自动凝胶成像分析仪系统购自上海培清科技有限公司; 实时荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 7500 型; 冷冻离心机购自珠海黑马医学仪器有限公司。

1.3 泡沫细胞的诱导、培养和鉴定

将 THP-1 细胞置于 RPMI-1640 培养基 (含 10%

胎牛血清)中,在 37 °C 的细胞培养箱(含 5% CO₂)中培养、传代。取第 3~5 代增殖旺盛的单核细胞进行实验。取含 0.3% BSA 的无血清 RPMI-1640 培养基使细胞重悬,加入佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)至 160 mmol/L,培养 72 h 诱导成巨噬细胞。光学显微镜下可观察到细胞由原来的悬浮状态变为贴壁状态,有伪足伸出,证明巨噬细胞被成功诱导。证实诱导成功后更换培养基,然后加入 ox-LDL 至 80 mg/L 共孵育 24 h,使之转化为泡沫细胞。最后通过油红 O 染色鉴定。将培养基移除,PBS 清洗,2 mL 4% 的甲醛溶液固定细胞 30 min,再用 PBS 清洗 2 次,1 mL 油红 O 溶液(用稀释水 3:2 稀释后用过滤纸过滤)染色 30 min,PBS 清洗 2~3 次后在显微镜下观察拍照。

1.4 实验分组

1.4.1 Ang-(1-7)对 ox-LDL 诱导的泡沫细胞 Notch 信号通路表达的影响 按 1.3 中的方法将 THP-1 细胞诱导分化成巨噬细胞,然后弃去上清,加入 RPMI-1640 培养基后随机分成 4 组:(1)对照组,仅加入培养基,不作其他处理;(2)ox-LDL 组,加入 80 mg/L 的 ox-LDL 孵育 48 h;(3)Ang-(1-7)组,加入 10⁻⁷ mol/L Ang-(1-7)预作用 30 min 后再加入 80 mg/L ox-LDL 共孵育 48 h;(4)A-779+Ang-(1-7)组,加入 10⁻⁵ mmol/L A-779 预作用半小时后,再加入 10⁻⁷ mol/L Ang-(1-7)作用 30 min,最后加入 80 mg/L ox-LDL 共孵育 48 h。孵育结束后收集上清用于细胞炎症因子的检测,收集各组细胞用于 mRNA 的提取和总蛋白的提取。

1.4.2 Ang-(1-7)对 Dll4. Fc 激活的 TLR-4/NF-κB 通路表达的调节作用 可溶性 Dll4 蛋白(Dll4. Fc)通过人全长 Dll4 cDNA 亚克隆到人 IgG1 融合蛋白载体中制备,具体方法参考 Fung 等^[12]文章。按 1.3 中的方法将 THP-1 细胞诱导分化成巨噬细胞,种到 6 孔板中,5×10⁵/孔,然后弃去上清,加入 RPMI-1640 培养基后随机分成 4 组:(1)对照组,仅加入培养基,不作其他处理;(2)Dll4. Fc 组,加入 1 μL(1 μg/μL) Dll4. Fc 孵育 24 h;(3)Ang-(1-7)组,加入 10⁻⁷ mol/L Ang-(1-7)预作用 30 min 后再加入 1 μL Dll4. Fc 共孵育 24 h;(4)A-779+Ang-(1-7)组,加入 10⁻⁵ mmol/L A-779 预作用半小时后,再加入 10⁻⁷ mol/L Ang-(1-7)作用 30 min,最后加入 1 μL Dll4. Fc 共孵育 24 h。孵育结束后收集各组细胞用于 mRNA 的提取和总蛋白的提取。

1.5 MTT 法检测细胞活性

将 THP-1 细胞接种于 96 孔板上,10⁴ 个/孔,其

中每孔液体容积为 200 μL,按 1.4 中分组进行细胞培养。孵育 48 h 后,每孔加入 MTT 溶液(5 g/L)20 μL,继续孵育 4 h。然后弃掉孔内的培养液,加入二甲亚砷溶液 150 μL,置摇床上充分震荡 10 min。最后把标本放置于酶标仪中,在 490 nm 波长下,分别测定各孔的光吸收值。

1.6 ELISA 法测定细胞炎症因子浓度

按 1.4 分组和 1.3 方法进行细胞培养,48 h 后收集培养液上清,ELISA 法检测细胞因子白细胞介素 1β(interleukin 1beta, IL-1β)、IL-6、肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor alpha, TNF-α)的浓度,操作按试剂盒说明书进行。

1.7 qRT-PCR 法检测 mRNA 表达水平

按上述实验分组和方法进行细胞培养,收集各组细胞,PBS 洗 2 次,离心取上清后将细胞沉淀振松,加入 1 mL TRIzol 试剂裂解细胞,室温放置 5 min,加入 200 μL 氯仿,剧烈振荡 15 s,室温静置 5 min,12 000 g 于 4 °C 下离心 15 min,吸出上层水相上清,加入 0.5 mL 异丙醇沉淀 RNA,室温放置 10 min 后于 4 °C 用 12 000 g 离心 10 min,弃上清,加入 75% 乙醇 1 mL,温和振荡,悬浮沉淀,4 °C 下 7 500 g 离心 5 min,尽量弃上清,自然干燥,所得 RNA 用 DEPC 水溶解。用移液枪吸取 1 μL 滴加到检测平台上,测定 OD 值(A260/280 的比值,与 RNA 的纯度有关,结果在 1.8~2.0 的范围内可表明所提取的 RNA 纯度较高),定量 RNA 浓度。首先,反转录合成 cDNA,按试剂盒说明书进行,总反应体积为 10 μL。引物由广州吉赛生物科技有限公司合成。引物序列见表 1。以 ACTB 为内参,反应体系为 10 μL,扩增条件为 95 °C 预变性 5 min,然后 95 °C 10 s,60 °C 34 s,共 40 个循环,最后熔解曲线 95 °C 15 s,60 °C 60 s,95 °C 15 s。PCR 实验在美国 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪中进行反应,采用 ΔΔCt 表示基因的表达水平。反应结束后,得出扩增曲线和熔解曲线,计算出 Ct 值,然后计算出 ΔCt(为目的基因的 Ct 值与内参基因的 Ct 值的差值),ΔΔCt = ΔCt_{实验组} - ΔCt_{对照组}。

1.8 Western blot 法检测蛋白表达水平

收集细胞后用试剂盒提取蛋白,BCA 法行蛋白定量。配 12% 的 SDS-PAGE 分离胶和 5% 的浓缩胶,用移液枪吸取 10 μL 样品至样品孔中,电泳,然后转移至 PVDF 膜中。室温下把膜浸入含 5% 脱脂奶粉和 0.5% 吐温-20 的 Tris 溶液中封闭 1 h,然后加入经稀释的一抗 Notch3(1:200)、Notch4(1:300)、Dll4(1:200)、Hes1(1:800)、ku70(1:10 000)、

TLR-4(1:1 000)和NF-κB(1:1 000)在4℃下孵育过夜,TBST洗膜,加入二抗室温下孵育1h,ECL法显影。β-actin和ku70作为内参,用Gel-Pro软件分析。

表 1. 引物序列

Table 1. Primer sequences for reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction

基因	序列(5'-3')
Notch1	上游 5'-CGAGGTCAACACAGACGAGT-3'
	下游 5'-CCACATCGTACTGGCACAGA-3'
Notch2	上游 5'-GGCAGACTGGTGACTTCACCT-3'
	下游 5'-CCTCCATTCTGACACCTGTGG-3'
Notch3	上游 5'-CGCGTGGCTTCTTTCTACTG-3'
	下游 5'-CGTTCACCGGATTTGTGTCA-3'
Notch4	上游 5'-GATGGGCTGGACACCTACAC-3'
	下游 5'-ACTCACACACACGCAAGTAA-3'
Jagged1	上游 5'-GCGTCCACGGCATCTGTAAT-3'
	下游 5'-AATACCCCTCAGGGCAGGAA-3'
Jagged2	上游 5'-TGGGACTGGGACAACGATAC-3'
	下游 5'-AGTGGCGCTGAGTAGTTC-3'
Dil1	上游 5'-GATTCTCTGATGACCTCGCA-3'
	下游 5'-TCCGTAGTAGTTCGTCACA-3'
Dil3	上游 5'-CGGATGCACTCAACAACCTA-3'
	下游 5'-CATCTTCAGGGCGATTCCAA-3'
Dil4	上游 5'-GGCTCCAACCTGCGAGAAGAA-3'
	下游 5'-CACAGTAGGTGCCCGTGAAT-3'
Hes1	上游 5'-CTGAGCACAGACCCAAAGTGT-3'
	下游 5'-CCTCGGTATTAACGCCCTCG-3'
TLR-4	上游 5'-GTGATGTTTGATGGACCTCTGA-3'
	下游 5'-AAGGAGCATTGCCCAACAG-3'
NF-κB	上游 5'-ACTGGCTGAGCGGATGCATC-3'
	下游 5'-TGCTGTGCTCAGAAGGAATG-3'
iNOS	上游 5'-AGCCCTTTACTTGACCTCTCA-3'
	下游 5'-GCAGCAAGTTCCATCTTTCA-3'
ACTB	上游 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3'
	下游 5'-CTCCTAATGTCACGCACGAT-3'

1.9 统计学分析方法

应用SPSS21.0软件进行统计学分析,定量资料的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间分析采用多组定量资料的单因素方差分析,多个样本资料之间的两两比较采用LSD-t检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ang-(1-7)对ox-LDL诱导的泡沫细胞炎症因子分泌的影响

ELISA结果显示,Ang-(1-7)可明显抑制ox-LDL

诱导的泡沫细胞分泌炎症因子IL-1β、IL-6和TNF-α,差异有统计学意义($P < 0.05$),而该作用可被A-779部分逆转($P < 0.05$;表2)。

表 2. Ang-(1-7)对ox-LDL诱导的泡沫细胞炎症因子分泌的影响($\bar{x} \pm s, ng/L, n = 3$)

Table 2. Effect of Ang-(1-7) on secretion of inflammatory cytokines in foam cells induced by ox-LDL ($\bar{x} \pm s, ng/L, n = 3$)

分组	IL-1β	IL-6	TNF-α
对照组	47.25±7.31	52.39±6.43	60.41±9.48
ox-LDL组	137.78±10.45 ^a	180.58±12.76 ^a	221.21±19.39 ^a
Ang-(1-7)组	98.71±8.77 ^{ab}	129.54±10.73 ^{ab}	133.41±17.52 ^{ab}
Ang-(1-7)+A-779组	121.55±9.8.8 ^{abc}	151.39±8.33 ^{abc}	155.13±13.56 ^{abc}

a为 $P < 0.05$,与对照组比较;b为 $P < 0.05$,与ox-LDL组比较;c为 $P < 0.05$,与Ang-(1-7)组比较。

2.2 Ang-(1-7)对ox-LDL诱导的泡沫细胞中Notch信号通路表达的影响

qRT-PCR结果显示,Notch信号的下游靶基因Hes1在ox-LDL诱导的泡沫细胞中表达明显增加($P < 0.05$),提示Notch信号在泡沫细胞中的激活,经Ang-(1-7)干预后,Hes1 mRNA的表达明显受到抑制($P < 0.05$)。

同时,ox-LDL刺激诱导生成的泡沫细胞中Notch信号通路各分子的表达发生了不同的变化。其中Notch1、Notch2受体及Dil1配体的mRNA表达较对照组下调($P < 0.05$);相反,Notch3、Notch4、Jagged2和Dil4的mRNA表达在泡沫细胞形成过程中明显上调($P < 0.05$);而Jagged1和Dil3 mRNA的表达无明显变化($P > 0.05$)。给予Ang-(1-7)干预后,与ox-LDL组比较,Notch1、Notch2和Dil1 mRNA表达明显增加($P < 0.05$),而Notch3、Notch4、Jagged2和Dil4的mRNA表达明显下降($P < 0.05$)。而Ang-(1-7)特异性受体抑制剂A-779可部分逆转Ang-(1-7)的作用(表3)。

进一步行Western blot检测Notch信号通路中蛋白表达的情况发现,ox-LDL刺激后,在泡沫细胞形成的过程中,Hes1蛋白的表达量明显增加,同样提示Notch信号通路的激活。同时,Notch3、Notch4、Dil4的蛋白表达量在泡沫细胞中也明显上升($P < 0.05$),Ang-(1-7)可部分抑制其蛋白表达($P < 0.05$),A-779在一定程度上能逆转Ang-(1-7)的作用($P < 0.05$;图1)。

表 3. Ang-(1-7) 对 ox-LDL 诱导泡沫细胞 Notch 信号通路 mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3. Effect of Ang-(1-7) on Notch signaling pathway genes in foam cells induced by ox-LDL ($\bar{x}\pm s, n=3$)

信号通路分子	对照组	ox-LDL 组	Ang-(1-7) 组	Ang-(1-7)+A-779 组
Notch1	1.00±0.12	0.60±0.02 ^a	0.79±0.16 ^{ab}	0.73±0.03 ^{ab}
Notch2	1.00±0.08	0.81±0.04 ^a	0.98±0.07 ^b	0.75±0.06 ^{ac}
Notch3	1.00±0.06	5.97±0.16 ^a	2.23±0.22 ^{ab}	1.46±0.39 ^{ac}
Notch4	1.03±0.31	3.90±1.11 ^a	1.73±0.39 ^b	5.00±1.20 ^{ac}
Dll1	1.00±0.01	0.80±0.15 ^a	1.30±0.08 ^{ab}	1.13±0.09 ^b
Dll3	1.00±0.09	1.23±0.31	1.22±0.14	1.23±0.00
Dll4	1.02±0.03	5.30±0.02 ^a	1.35±0.29 ^b	2.63±0.19 ^{abc}
Jagged1	1.00±0.05	0.96±0.20	1.10±0.08	1.16±0.19
Jagged2	1.00±0.05	1.60±0.32 ^a	1.21±0.16 ^b	1.30±0.09
Hes1	1.01±0.16	4.43±0.75 ^a	2.91±0.87 ^{ab}	3.65±0.41 ^{ac}

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL 组比较; c 为 $P<0.05$, 与 Ang-(1-7) 组比较。

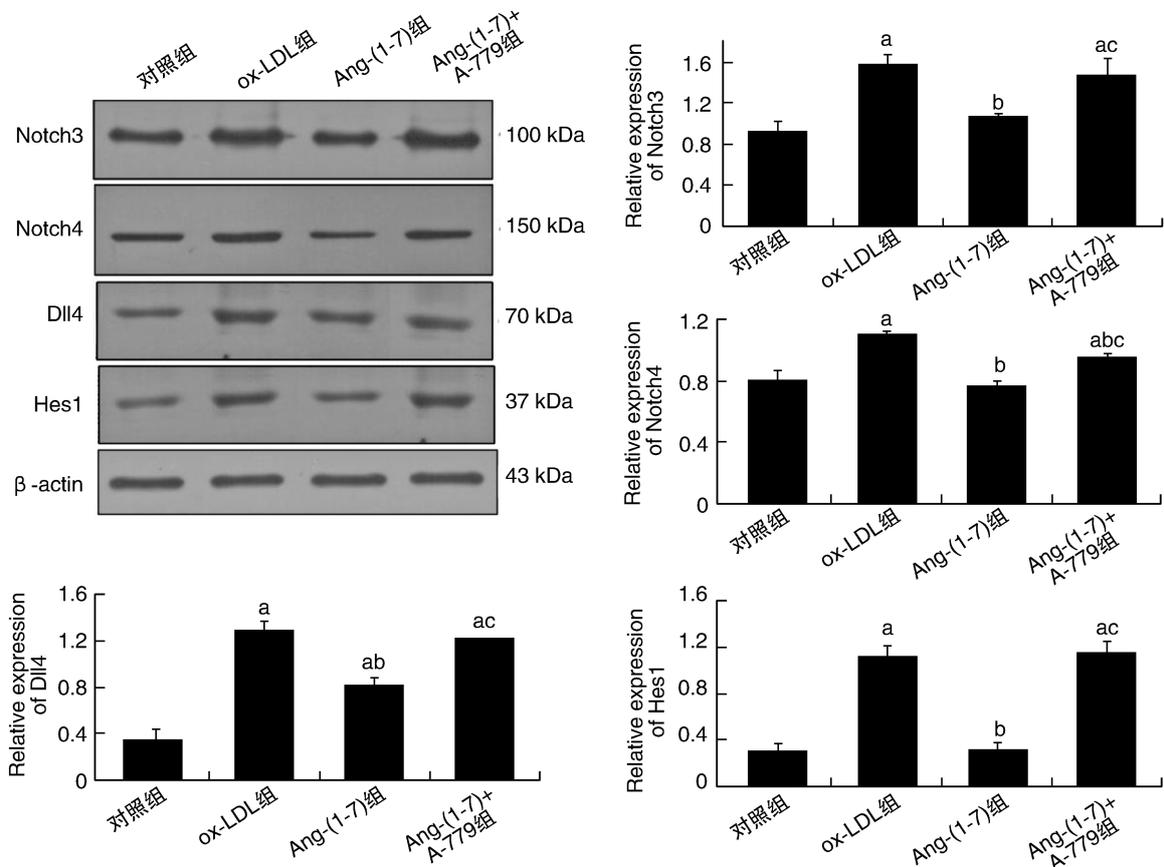


图 1. Ang-(1-7) 对 ox-LDL 诱导的泡沫细胞中 Notch 信号通路蛋白表达的影响 a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL 组比较; c 为 $P<0.05$, 与 Ang-(1-7) 组比较。

Figure 1. Effect of Ang-(1-7) on Notch signaling pathway proteins expression in foam cells induced by ox-LDL

2.3 Ang-(1-7) 对 Dll4. Fc 刺激的巨噬细胞炎症因子分泌的影响

ELISA 结果显示, Dll4. Fc 与巨噬细胞共孵育可明显诱导巨噬细胞分泌炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和

TNF- α , 而 Ang-(1-7) 可明显抑制 Dll4. Fc 诱导的巨噬细胞分泌炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α , 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 该作用可被 A-779 部分逆转 ($P<0.05$; 表 4)。

表 4. Ang-(1-7) 对 Dll4. Fc 刺激的巨噬细胞炎症因子分泌的影响($\bar{x}\pm s, ng/L, n=3$)

Table 4. The effect of Ang-(1-7) on inflammatory cytokines secretion in macrophage stimulated by Dll4. Fc ($\bar{x}\pm s, ng/L, n=3$)

分组	IL-1 β	IL-6	TNF- α
对照组	28.14 \pm 4.31	37.68 \pm 3.13	49.53 \pm 6.72
Dll4. Fc 组	99.19 \pm 8.41 ^a	139.98 \pm 10.47 ^a	186.21 \pm 15.23 ^a
Ang-(1-7) 组	68.68 \pm 5.56 ^{ab}	89.74 \pm 6.86 ^{ab}	123.46 \pm 11.78 ^{ab}
Ang-(1-7)+ A-779 组	88.51 \pm 6.08 ^{abc}	120.45 \pm 6.21 ^{abc}	130.13 \pm 10.59 ^{abc}

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 Dll4. Fc 组比较; c 为 $P<0.05$, 与 Ang-(1-7) 组比较。

表 5. Ang-(1-7) 对 Dll4. Fc 激活的 TLR-4/NF- κ B 通路 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5. The effect of Ang-(1-7) on TLR-4/NF- κ B signaling pathway transcription in macrophages stimulated by Dll4. Fc ($\bar{x}\pm s, n=3$)

分组	Hes1	TLR-4	NF- κ B	iNOS
对照组	1.01 \pm 0.14	1.03 \pm 0.27	1.01 \pm 0.15	1.01 \pm 0.16
Dll4. Fc 组	4.52 \pm 0.67 ^a	5.11 \pm 1.86 ^a	6.25 \pm 1.34 ^a	3.47 \pm 0.51 ^a
Ang-(1-7) 组	1.20 \pm 0.13 ^{ab}	1.32 \pm 0.17 ^{ab}	1.53 \pm 0.34 ^b	1.41 \pm 0.01 ^b
Ang-(1-7)+ A-779 组	2.88 \pm 0.70 ^{abc}	2.34 \pm 0.64 ^{bc}	2.64 \pm 0.72 ^{ab}	2.15 \pm 0.10 ^{abc}

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 Dll4. Fc 组比较; c 为 $P<0.05$, 与 Ang-(1-7) 组比较。

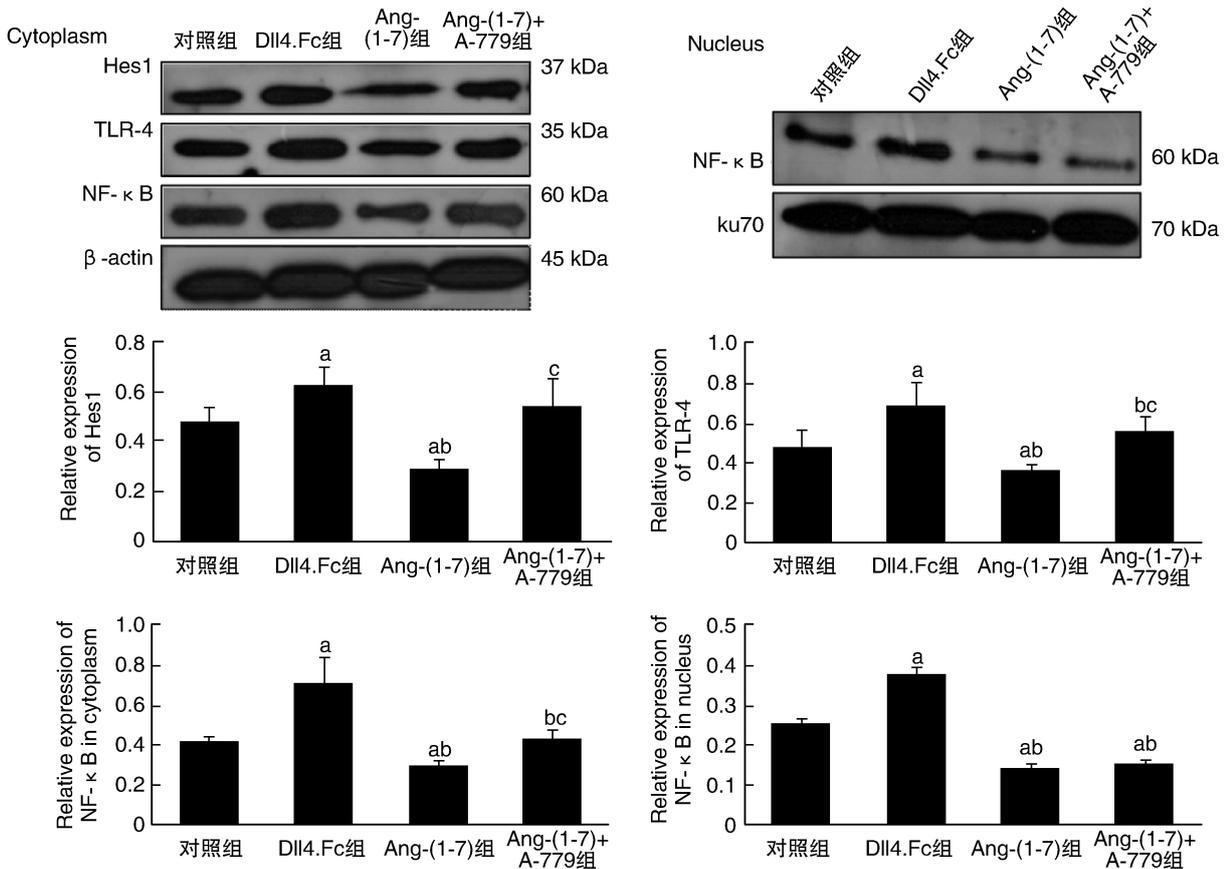


图 2. Ang-(1-7) 对 Dll4. Fc 激活的 TLR-4/NF- κ B 通路蛋白表达的影响 图中条带为 Dll4. Fc 与巨噬细胞共孵育激活 Notch 通路后, 细胞内分子 Hes1 蛋白、TLR-4 蛋白以及胞质 NF- κ B 蛋白和胞核 NF- κ B 蛋白的表达。a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 Dll4. Fc 组比较; c 为 $P<0.05$, 与 Ang-(1-7) 组比较。

Figure 2. The effect of Ang-(1-7) on TLR-4/NF- κ B signaling pathway proteins expression in macrophages stimulated by Dll4. Fc

2.4 Ang-(1-7) 对 Dll4. Fc 激活的 TLR-4/NF- κ B 通路表达的调节作用

利用 Dll4. Fc 与巨噬细胞结合激活 Notch 信号通路, 不但发现 Hes1 mRNA (表 5) 和蛋白 (图 2) 表达明显增加 ($P<0.05$), TLR-4、NF- κ B mRNA 和蛋白的表达, 还有 iNOS mRNA 的表达也明显增加 ($P<0.05$)。给予 Ang-(1-7) 干预, 不但可明显下调 Hes1 mRNA 和蛋白的表达 ($P<0.05$), 也可明显抑制 TLR-4、NF- κ B mRNA 和蛋白的表达, 以及 iNOS mRNA 的表达 ($P<0.05$)。A-779 可部分抑制 Ang-(1-7) 的作用。

3 讨论

大量的研究已发现,RAS 系统在心血管调节中发挥着重要作用,其中 Ang-(1-7) 被证实具有促进平滑肌细胞前列腺素释放、抑制平滑肌细胞增殖、防止血管成形术后再狭窄等血管重塑的作用,既往的研究同时表明,Ang-(1-7) 可抑制巨噬细胞浸润和炎症因子释放,具有减轻 As 炎症反应的作用^[8,14-18]。但具体机制暂不明确。

近年来,Notch 信号通路在炎症反应,特别是 As 中的作用备受关注^[19-20]。Notch 基因在 1919 年被首次发现,后逐渐被证实在生物物种中广泛表达,是一高度保守的信号通路。已发现,Notch3 在血管平滑肌细胞的迁移和增殖中有重要的作用^[21]。Mack 等^[22]也报道敲除 Notch1 基因可加速 As 的发展。而抑制 Dll4 介导的 Notch 信号激活可抑制 As 的发展和胰岛素的抵抗^[23]。Fung 等^[12]也证实 Notch 信号通路在巨噬细胞介导的炎症应答及动脉粥样斑块中高表达,并认为其具有促进炎症和 As 的作用。因此,目前普遍认为 Notch 信号通路参与了 As 的发生和发展过程。

近年来,不断有研究发现 RAS 与 Notch 通路间存在调节作用。2013 年 Ozasa 等^[24]发现 Notch 信号通路可通过促进血管平滑肌细胞增殖和迁移,从而介导 Ang II 诱导血管重构的过程。同年,Qiao 等^[25]也报道,通过 γ 分泌酶抑制剂抑制 Notch 信号通路可抑制 Ang II 诱导的肺血管重构。Koshizaka 等^[26]发现替米沙坦可通过抑制 Notch 信号通路从而抑制 Ins2 Akita 糖尿病大鼠的肾损伤。以上均说明,Notch 信号通路参与了 RAS 介导的心血管系统的调节作用。Zhang 等^[11]发现,血管紧张素转换酶(angiotensin-converting enzyme, ACE)在暴露于机械拉伸的肺上皮细胞中高表达,而沉默肝素结合细胞因子(midkine, MK)或其受体 Notch2 可部分逆转这种改变,甚至提出了 MK-Notch2-ACE 信号通路。所以,我们有理由相信 Ang-(1-7) 对 As 的调节中,Notch 信号通路可能参与其中。研究表明,泡沫细胞的形成是 As 关键环节,所以通过研究泡沫细胞中分子信号通路的变化有助于阐明 Ang-(1-7) 对 As 的作用机制。

我们既往的研究表明,Ang-(1-7) 具有减轻兔腹主动脉球囊损伤后的血管重塑作用^[14]。本研究结果显示,Ang-(1-7) 能明显抑制 ox-LDL 诱导的巨噬细胞炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的产生,故 Ang-(1-7) 在 As 中具有保护作用。同时,本研究还发现

Ang-(1-7) 对 ox-LDL 诱导后的巨噬细胞中 Notch 信号通路有不同程度的影响,有部分出现活化增强,也有部分表现为活化受抑制,还有部分无明显改变。其中 Notch3、Notch4 和 Dll4 的表达明显受抑制。目前已有研究发现,在动脉粥样斑块中的巨噬细胞主要表达 Notch3 受体和 Dll4 配体,阻断 Dll4 介导的 Notch 信号可降低 MCP-1 表达,抑制巨噬细胞聚集,从而抑制 As 进展^[12,23]。这与 Ang-(1-7) 表现出的炎症抑制作用和 As 保护作用一致。

为了进一步研究 Ang-(1-7) 对 Dll4 信号通路的调节作用,本研究利用 Dll4. Fc 激活 Notch 信号通路,观察 Ang-(1-7) 对炎症因子及下游信号通路的影响。本研究发现,Dll4. Fc 与巨噬细胞共孵育后,细胞内的 Hes1 表达明显增加,提示 Notch 信号通路被激活,同时伴随 TLR-4/NF- κ B 通路表达的增加和炎症因子分泌增加。众所周知,TLR 是表达在巨噬细胞表面的主要模式识别受体,在炎症和 As 中发挥重要的作用。据报道,TLR 信号通路与 Notch 信号通路之间存在相互作用。国内 Zhang 等^[27]发现在巨噬细胞中,激活 TLR-4 可上调 Notch1 和 Notch2 的表达,而 Notch 信号通路可以调节 TLR 诱导的炎症反应,Notch 信号通路可能作为调节 TLR 信号通路的新靶点。本研究证实 Ang-(1-7) 可抑制 Notch 信号激活所致的 TLR-4/NF- κ B 通路的激活和炎症因子分泌,并可被其特异性受体拮抗剂 A-779 部分逆转,提示 Ang-(1-7) 减轻 As 炎症反应的作用可能通过 Dll4-TLR-4-NF- κ B 通路实现。

总的来说,本研究发现 Ang-(1-7) 具有调节 Notch 信号通路的作用,特别是能抑制 Dll4 激活的 Notch 信号通路,从而抑制巨噬细胞中 TLR-4/NF- κ B 通路表达和炎症因子分泌的作用,这可能是 Ang-(1-7) 减轻 As 炎症反应的重要机制之一。而 Ang-(1-7) 对 Notch 家族成员在 As 中的不同影响,其具体作用仍有待进一步的研究去证实。

[参考文献]

- [1] Robinson JG, Fox KM, Bullano MF, et al. Atherosclerosis profile and incidence of cardiovascular events: a population-based survey [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2009, 9: 46.
- [2] Ference BA. Causal effect of lipids and lipoproteins on atherosclerosis: lessons from genomic studies [J]. Cardiol Clin, 2018, 36(2): 203-211.
- [3] Libby P, Ridker PM, Hansson GK, et al. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice [J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(23): 2129-2138.

- [4] de Souza-Neto FP, Carvalho Santuchi M, de Morais E Silva M, et al. Angiotensin-(1-7) and alamandine on experimental models of hypertension and atherosclerosis [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2018, 20(2): 17.
- [5] 曾武涛, 陈伟燕, 冷秀玉, 等. 血管紧张素-(1-7)对兔腹主动脉球囊损伤后血浆可溶性细胞凋亡相关因子及再狭窄的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(10): 802-808.
- [6] Zeng WT, Chen WY, Leng XY, et al. Impairment of cardiac function and remodeling induced by myocardial infarction in rats are attenuated by the nonpeptide angiotensin-(1-7) analog AVE 0991 [J]. *Cardiovasc Ther*, 2012, 30(3): 152-161.
- [7] Zeng WT, Chen WY, Leng XY, et al. Chronic angiotensin-(1-7) administration improves vascular remodeling after angioplasty through the regulation of the TGF-beta/Smad signaling pathway in rabbits [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 389(1): 138-144.
- [8] 王立军, 马虹, 廖新学, 等. 血管紧张素-(1-7)对氧化低密度脂蛋白诱导人血管内皮细胞单核细胞趋化蛋白1表达的影响[J]. *中华高血压杂志*, 2008, 16(10): 889-893.
- [9] Roca C, Adams RH. Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling [J]. *Genes Dev*, 2007, 21(20): 2511-2524.
- [10] Regan JN, Majesky MW. Building a vessel wall with Notch signaling [J]. *Circ Res*, 2009, 104(4): 419-421.
- [11] Zhang R, Pan Y, Fanelli V, et al. Mechanical stress and the induction of lung fibrosis via the midkine signaling pathway [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 192(3): 315-323.
- [12] Fung E, Tang SM, Canner JP, et al. Delta-like 4 induces Notch signaling in macrophages; implications for inflammation [J]. *Circulation*, 2007, 115(23): 2948-2956.
- [13] Hans CP, Koenig SN, Huang N, et al. Inhibition of Notch1 signaling reduces abdominal aortic aneurysm in mice by attenuating macrophage-mediated inflammation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(12): 3012-3023.
- [14] 曾武涛, 陈伟燕, 冷秀玉, 等. 血管紧张素-(1-7)在减轻兔腹主动脉球囊损伤后血管壁胶原合成中的作用[J]. *中华心血管病杂志*, 2010, 38(6): 531-538.
- [15] Wang LP, Fan SJ, Li SM, et al. Protective role of ACE2-Ang-(1-7) in myocardial fibrosis by downregulating KCa3.1 channel via ERK1/2 pathway [J]. *Pflugers Arch*, 2016, 468(11-12): 2041-2051.
- [16] Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, et al. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS axis of the renin-angiotensin system; focus on angiotensin-(1-7) [J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(1): 505-553.
- [17] Yang G, Istas G, Hoges S, et al. Angiotensin-(1-7)-induced Mas receptor activation attenuates atherosclerosis through a nitric oxide-dependent mechanism in apolipoproteinE-KO mice [J]. *Pflugers Arch*, 2018, 470(4): 661-667.
- [18] Touz RM, Montezano AC. Angiotensin-(1-7) and vascular function; the clinical context [J]. *Hypertension*, 2018, 71(1): 68-69.
- [19] Binesh A, Devaraj SN, Devaraj H. Inhibition of nuclear translocation of notch intracellular domain (NICD) by diosgenin prevented atherosclerosis disease progression [J]. *Biochimie*, 2018, 148: 63-71.
- [20] Aquila G, Pannella M, Morelli MB, et al. The role of Notch pathway in cardiovascular diseases [J]. *Glob Cardiol Sci Pract*, 2013, 2013(4): 364-371.
- [21] Delbosc S, Glorian M, Le Port AS, et al. The benefit of docosahexanoic acid on the migration of vascular smooth muscle cells is partially dependent on Notch regulation of MMP-2/-9 [J]. *Am J Pathol*, 2008, 172(5): 1430-1440.
- [22] Mack JJ, Mosqueiro TS, Archer BJ, et al. NOTCH1 is a mechanosensor in adult arteries [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1620.
- [23] Fukuda D, Aikawa E, Swerski FK, et al. Notch ligand delta-like 4 blockade attenuates atherosclerosis and metabolic disorders [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(27): E1868-1877.
- [24] Ozasa Y, Akazawa H, Qin Y, et al. Notch activation mediates angiotensin II-induced vascular remodeling by promoting the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells [J]. *Hypertens Res*, 2013, 36(10): 859-865.
- [25] Qiao LN, Xu HB, Shi K, et al. Role of notch signal in angiotensin II induced pulmonary vascular remodeling [J]. *Transl Pediatr*, 2013, 2(1): 5-13.
- [26] Koshizaka M, Takemoto M, Sato S, et al. An angiotensin II type I receptor blocker prevents renal injury via inhibition of the Notch pathway in Ins2 Akita diabetic mice [J]. *Exp Diabetes Res*, 2012, 2012: 159874.
- [27] Zhang Q, Wang C, Liu Z, et al. Notch signal suppresses Toll-like receptor-triggered inflammatory responses in macrophages by inhibiting extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated nuclear factor κ B activation [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(9): 6208-6217.

(此文编辑 许雪梅)